

Generierung und Charakterisierung zweier Mauslinien
für die Untersuchung der Rolle von Strumpellin
in der Hereditären Spastischen Paraplegie Typ SPG8

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dr. med. univ. Amir Jahic

geboren am 23.09.1980 in Tuzla, Bosnien und Herzegowina (ehem. Jugoslawien)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Christian Hübner

Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Jena

2. PD Dr. Dr. Michael Kiehntopf

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Universitätsklinikum Jena

3. Prof. Dr. Christoph Clemen

Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Köln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17.10.2017

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
AD	autosomal dominant
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AR	autosomal rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>engl. Complementary DNA</i>
CH ₃ COOH	Essigsäure
CIP	<i>eng. Calf Intestin Phosphatase</i>
Cl	Chlorid
CO ₂	Kohlendioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
DCTN1	Dynactin
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	desoxy-Guansintriphosphat
DNA	<i>eng. Desoxyribonucleicacid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>eng. Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EtOH	Ethanol
EVS	Exome Variant Server
Ex	Exon
GLUT1	Glucose Transporter 1
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>eng. Hanks' Balanced Salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HPLC-H ₂ O	<i>engl. High pressure liquid chromatography-Wasser</i>

Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LFA-1	<i>eng. Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
M	Mol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	<i>eng. messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxyd
OD	optische Dichte
PBS	<i>engl. Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>engl. Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>lat. Potentia hydrogenii</i>
RbCl	Rubidiumchlorid
REEP1	Receptor Expression-Enhancing Protein 1
RNA	<i>eng. Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease
Rpm	<i>eng. Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>engl. Standard deviation</i>
SDS	<i>engl. Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>engl. Standard error of the mean</i>
SSC	<i>engl. Saline-sodium citrate</i>
SSPE	<i>engl. Saline-sodium phosphate EDTA</i>
Strept	Streptomycin
TCR	<i>eng. T-cell receptor</i>
TE	Tris-EDTA

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>eng. Unit</i> (Einheit)
UV	Ultraviolett
WASH	Wiskot Aldrich Scar Homolog

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Aufbau des motorischen Systems.....	3
2.2 Axone.....	4
2.3 Erbliche Erkrankungen langer Axone.....	6
2.4 Hereditäre Spastische Paraplegien.....	6
2.5 Hereditäre Spastische Paraplegie Typ SPG8.....	7
2.5.1 Klinik und Genetik.....	7
2.5.2 Physiologisches und pathophysiologisches Umfeld von Strumpellin.....	8
3. Ziele der Arbeit.....	13
4. Material und Methoden.....	14
4.1 Materialien.....	14
4.1.1 Chemikalien.....	14
4.1.2 Antikörper.....	14
4.1.3 Oligonukleotide (Primer).....	14
4.1.4 Grössenstandards.....	14
4.1.5 Vektoren.....	14
4.1.6 Bakterienstämme und Mausstämme.....	14
4.2 Methoden.....	15
4.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	15
4.2.1.1 Herstellung von chemokompetenten Bakterien.....	15
4.2.1.2 Transformation von chemokompetenten Bakterien.....	15
4.2.1.3 Screening einer Lambda-Bibliothek.....	16
4.2.2 Klonierungsmethoden.....	18
4.2.2.1 Restriktionsverdau.....	18
4.2.2.2 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden und Dephosphorylierung.....	18
4.2.2.3 Elektrophorese auf Agarosegel.....	19
4.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	20
4.2.2.5 Sequenzierung.....	21
4.2.3 Isolation und Aufreinigung der Nukleinsäuren.....	21
4.2.3.1 Mini-Präparation der Plasmid-DNA.....	21
4.2.3.2 Midi-Präparation der Plasmid-DNA.....	22
4.2.3.3 Isolation der DNA aus Phagen.....	22

4.2.3.4 Isolation der DNA aus Agarosegelen.....	23
4.2.3.5 Aufreinigung der DNA für die Embryonalstammzell-(ES-) Zellkultur.....	23
4.2.3.6 HotSHOT Extraktion genomischer DNA aus Schwanzspitzen der Maus.....	24
4.2.3.7 Isolation der RNA und Überprüfen der RNA-Qualität.....	24
4.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	25
4.2.4.1 Polymerase Kettenreaktion.....	25
4.2.4.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	25
4.2.4.3 Quantitative PCR (qPCR) und entsprechendes Primerdesign.....	26
4.2.4.4 Westernblot.....	26
4.2.4.5 Southernblot.....	26
4.2.4.6 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit ³² P und Membran-Hybridisierung.....	27
4.2.5 Zellbiologische Methoden.....	27
4.2.5.1 ES-Zellkultur und Blastocysteninjektion.....	27
4.2.5.2 Präparation und Kultivierung von primären kortikalen Neuronen und die Bestimmung der Neuronenzahl.....	27
4.2.5.3 Fixierung von primären kortikalen Neuronen in der Kultur.....	29
4.2.5.4 Präparation und Kultivierung von primären Fibroblasten.....	29
4.2.6 Immunhistologische Methoden.....	29
4.2.6.1 Immunfluoreszenz-Färbung von primären kortikalen Neuronen.....	29
4.2.6.2 Transfektion und Fluoreszenzfärbung von primären Fibroblasten.....	30
4.2.7 Histologie: Mausperfusion, Gewebefixation und Herstellung von Rückenmarksschnitten.....	30
4.2.8 Tierexperimente.....	31
4.2.8.1 Messung des Körpergewichtes.....	31
4.2.8.2 Messung des Fußbasenwinkels.....	31
4.2.8.3 Rotarod-Analyse.....	31
4.2.9 Messung von Zellauswüchsen in primären kortikalen Neuronen.....	32
5. Ergebnisse.....	33
5.1 Generierung von Mauslinien mit genetisch modifiziertem SPG8-Locus.....	33
5.1.1 Klonierung des Gene-Targeting-Vektors.....	33

5.1.2 Nachweis homologer Rekombination und Generierung chimärer Mäuse.....	35
5.1.3 Nachweis der Keimbahntransmission.....	37
5.1.4 Etablierung der Mauslinien.....	37
5.1.4.1 Etablierung der <i>knockin</i> Linie.....	37
5.1.4.2 Genotypisierungsergebnisse der <i>knockin</i> Linie.....	38
5.1.4.3 Etablierung der <i>knockout</i> Linie.....	39
5.1.4.4 Genotypisierungsergebnisse der <i>knockout</i> Linie.....	40
5.2 Charakterisierung von Mauslinien mit genetisch modifiziertem SPG8-Locus.....	42
5.2.1 Charakterisierung der <i>knockin</i> Linie.....	42
5.2.1.1 Kreuzung und Lebensfähigkeit.....	42
5.2.1.2 Körpergewicht.....	44
5.2.1.3 Quantifizierung der motorischen Beeinträchtigung.....	45
5.2.1.3.1 Messung des Fußbasenwinkels.....	45
5.2.1.3.2 Analyse mit Rotarod.....	46
5.2.1.4 Histopathologische Untersuchungen des Rückenmarks.....	47
5.2.1.5 <i>Ex vivo</i> Neuritenentwicklung in kortikalen Neuronen.....	48
5.2.1.6 Genexpressionsanalyse aus Gehirngewebe.....	49
5.2.2 Charakterisierung der <i>knockout</i> Linie.....	50
5.2.2.1 Kreuzung und Lebensfähigkeit.....	50
5.2.2.2 Körpergewicht.....	52
5.2.2.3 Quantifizierung der motorischen Beeinträchtigung.....	52
5.2.2.3.1 Messung des Fußbasenwinkels.....	52
5.2.2.3.2 Analyse mit Rotarod.....	53
5.2.2.4 <i>Ex vivo</i> Neuritenentwicklung in kortikalen Neuronen.....	54
5.2.2.5 <i>Ex vivo</i> Untersuchung von endo-, lyso- und autophagosomalen	
Kompartimenten in Fibroblasten adulter Mäuse.....	55
5.2.2.6 Genexpressionsanalyse aus Gehirngewebe.....	57
5.2.2.7 Strumpellin und FAM21 Westernblot-Analyse in Gehirnlysaten.....	58
6. Diskussion.....	60
6.1 Generierung der Mauslinien.....	60
6.2 Charakterisierung der <i>knockin</i> Linie.....	61
6.3 Charakterisierung der <i>knockout</i> Linie.....	64

7. Schlussfolgerungen.....	69
8. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	71
9. Anhang.....	78
Antikörper.....	78
Größenstandards.....	78
Oligonukleotide (Primer).....	79
Tabellarischer Lebenslauf.....	80
Liste der Publikationen.....	81
Verzeichnis bereits eingeworbener Drittmittel.....	81
Tagungsbeiträge.....	82
Wissenschaftliche Vorträge.....	82
Danksagung.....	83
Ehrenwörtliche Erklärung.....	84

1. Zusammenfassung

Das motorische Nervensystem ist für die Kontrolle von Körperhaltung und Willkürbewegungen zuständig. Seine zellulären Hauptbestandteile sind obere und untere Motoneurone. Diese Nervenzellen haben extrem lange axonale Fortsätze, deren lebenslanger Erhalt damit eine besondere Herausforderung für die Zellen ist.

Die erblichen Axonopathien des oberen Motoneurons werden als *Hereditäre Spastische Paraplegien* (HSP) bezeichnet. Hauptsymptome der HSP sind zunehmende Schwäche und Spastik der Beine. Derzeit sind über 50 Gene und mehr als 70 Genloci mit einem HSP Phänotyp assoziiert.

Die HSP Typ SPG8 ist eine autosomal dominant vererbte Form, die bisher mit neun publizierten Mutationen im Gen *KIAA0196* bzw. dem entsprechenden Genprodukt Strumpellin Protein assoziiert ist. Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Daten zum Pathomechanismus bei SPG8 waren inkonsistent. Die bestehende Hypothese zum Mutationsmechanismus war Haploinsuffizienz. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei *KIAA0196* Mauslinien generiert und charakterisiert. Es handelte sich dabei um einen *Knockin* einer als humanpathogen beschriebenen Variante (p.N471D) und einen konventionellen *Knockout*. Ziel dieser Ansätze war die Aufklärung des Mutations- und Pathomechanismus bei SPG8.

Der *Knockin* war sowohl im heterozygoten als auch im homozygoten Zustand lebensfähig und fertil. Dasselbe galt für den heterozygoten *Knockout*, während homozygote *Knockout* Tiere schon im Embryonalstadium verstarben. Über die Untersuchung des motorischen Phänotyps mittels Fußbasenwinkel-Messung und Rotarodanalyse wurde in *Knockins* und heterozygoten *Knockouts* das Vorliegen einer Bewegungsstörung ausgeschlossen. Auch das Gewicht über die Zeit zeigte keine Genotyp-spezifischen Anomalien. Die histopathologische Untersuchung relevanter Rückenmarksbereiche im heterozygoten *Knockin* zeigte keine augenscheinlichen morphologischen Auffälligkeiten. Die *ex vivo* Neuronenentwicklung war in beiden Linien ebenfalls normal. In primären Fibroblastenkulturen adulter heterozygoter *knockout* Tiere wurden morphologischen Auffälligkeiten der Endo-, Lyso- und Autophagosomen sowie eine funktionelle Beeinträchtigung des endosomalen Systems ausgeschlossen. In *Knockins* war die Transkriptmenge von *KIAA0196* unverändert, während sie im heterozygoten *Knockout* reduziert war. Entsprechende Daten ergaben sich auch auf Proteinebene. Die Transkriptmenge einiger direkter (VCP, Swip) und indirekter (Wash1, Fam21, Vps35) Strumpellin-Interaktionspartner aus den WASH- und Retromer-Komplexen war im heterozygoten

Knockout unverändert, während Fam21 auf Proteinebene im heterozygoten *Knockout* eine Mengenreduktion um ca. 35% zeigte.

Die Daten zum *Knockin* legen nahe, dass diese Linie kein valides HSP Mausmodell ist. Unterstützung fand diese Interpretation durch eine vom Verfasser parallel durchgeführte und publizierte Studie. Hierin wurde eine neue Strumpellinvariante präsentiert und die bisher publizierten Mutationen in Bezug auf ihre Pathogenität diskutiert. Die p.N471D Variante zeigte niedrige Pathogenität-Vorhersagescores und liegt außerhalb eines als kritisch definierten Bereiches im Strumpellin Protein. Bei der p.N471D Variante handelt es sich demnach wahrscheinlich um einen seltenen, nicht pathogenen Polymorphismus.

Auch der heterozygote *Knockout* kann nicht als valides HSP Mausmodell gelten. Die hier erhobenen Daten zeigen, dass eine Mengenreduktion an funktionsfähigem Strumpellin keinerlei Phänotyps nach sich zieht und dass auch die Neuronenentwicklung und relevante subzelluläre Systeme ungestört bleiben.

Die erzielten Ergebnisse mögen unter Berücksichtigung der embryonalen Letalität des homozygoten *Knockouts* in Bezug auf den Mutationsmechanismus bei SPG8 folgendermassen interpretiert werden: die heterozygote Geninaktivierung führt nicht zu einer Strumpellin-Haploinsuffizienz. Aufgrund der embryonalen Letalität im homozygoten *Knockout* (=komplette Geninaktivierung) ist ein dominant negativer Effekt von mutiertem auf das gesunde Strumpellinallel in SPG8 Patienten auch nicht wahrscheinlich. Eine Alternative könnte eine toxische Genveränderung, beispielsweise durch die Ablagerung von mutiertem Strumpellin und Bildung pathologischer Proteinaggregate, darstellen. Das Testen dieser Hypothese ist nur an einem validen Mausmodell für HSP Typ SPG8 möglich. Dazu würde ein *Knockin* einer tatsächlich pathogenen Mutation benötigt.

2. Einleitung

2.1 Aufbau des motorischen Nervensystems

Die Hauptbestandteile des motorischen Nervensystems sind Motoneurone. Sie werden in obere Motoneurone (OMN) und in untere Motoneurone (UMN) eingeteilt. In der Regel projiziert das obere Motoneuron, dessen Zellkörper im primär motorischen Hirnkortex lokalisiert ist, sein Axon auf das untere Motoneuron. Die Axone der unteren Motoneurone verlaufen weiter in periphere Nerven und enden an den neuromuskulären Endplatten der innervierten Muskeln.

Die Motoneurone stehen mit anderen Neuronen über Synapsen im Kontakt. Ein Motoneuron besteht aus dem *Soma* und in der Regel aus zwei Arten von Fortsätzen: den *Dendriten* und dem *Axon*, die vom Zellkörper ausgehen. Die Dendriten sind die Strukturen des Signaleingangs, das Axon ist die Struktur des Signalausgangs (Abb. 1). Die Motoneurone haben ein relativ großes Volumen und eine große Zelloberfläche. Somit besitzen Motoneurone einen relativ großen Eiweißstoffwechsel und einen hohen intrazellulären Stofftransport (axoplasmatischer Fluss). Des Weiteren sind sie durch das weitgehend fehlende Regenerationsvermögen gekennzeichnet.

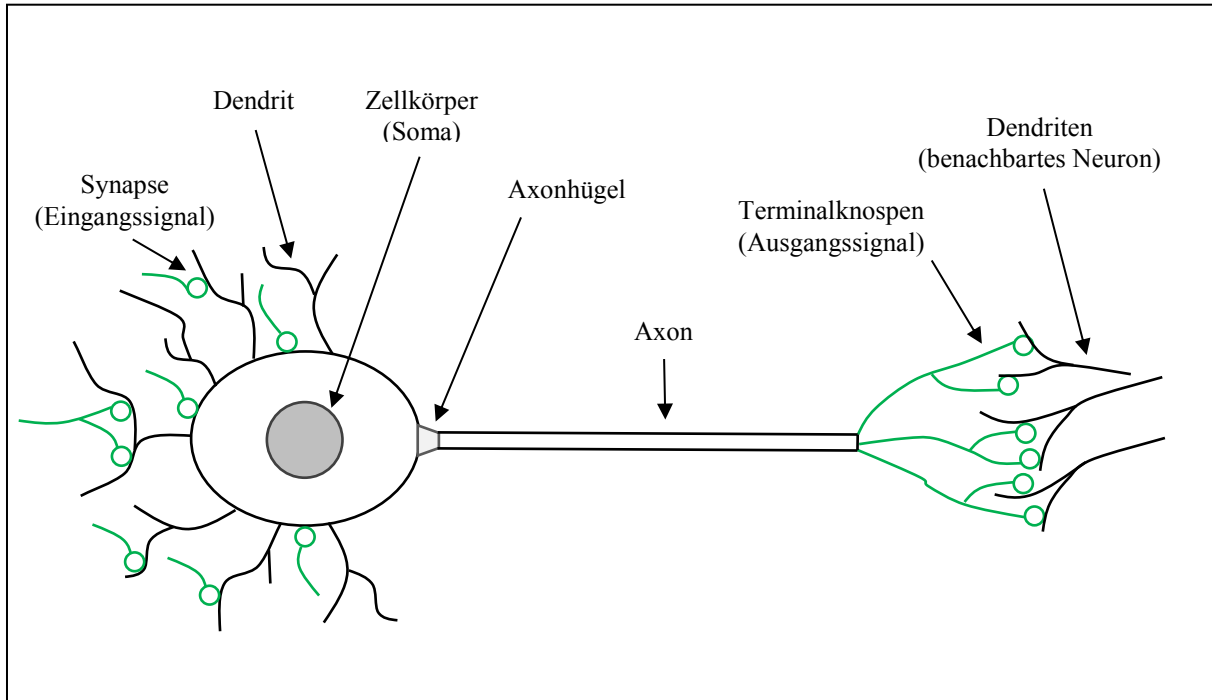


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Motoneurons. Der Zellkörper und die Dendrite erhalten synaptische Inputs von anderen Neuronen (grün). Das Axon leitet das Signal bzw. die im Zellsoma gebildeten Nährstoffe in die Axonperipherie weiter. Über die synaptischen Endkolben axonaler Aufzweigungen erfolgt die Signalübertragung an Nachbarneurone (schwarz).

2.2 Axone

Das Axon ist als „ausführendes Organ“ der Nervenzelle zu betrachten. Es entspringt an einem Vorsprung des Zellkörpers, dem Axonhügel, gibt Abzweigungen ab und zweigt sich am Ende als Endbäumchen auf. Anders als bei den Dendriten bleibt der Durchmesser eines Axons über die gesamte Verlaufsstrecke nahezu gleich, in Abhängigkeit vom Typ der Nervenzelle zwischen 0,05 und 20 µm. Ein menschliches Axon kann bis zu einem Meter lang werden (z.B. Motoneuron) und enthält in seinem Inneren (*Axoplasma*), im Vergleich zum Zytoplasma des Perikaryons, kein raues endoplasmatisches Retikulum, aber tubuläre Anteile des glatten endoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien (Goldberg 2003, Merianda et al. 2009). Charakteristisch ist auch der reiche Bestand an Aktinfilamenten und zumeist längsorientierten Anteilen des Zytoskeletts, den *Neurofilamenten* und *Neurotubuli*. Diese Strukturen sind u.a. auch am axonalen Transport beteiligt. Dabei werden Stoffe, intra-/extrazelluläre Strukturen und/oder Zellorganellen innerhalb des Axons transportiert. Relativ zu der Größe der Nervenzelle ist der axonale Stofftransport als sehr groß zu betrachten. Große Neurone wie z.B. Motoneurone erneuern täglich etwa ein Drittel ihres gesamten Proteingehaltes, was nur durch einen intensiven und raschen axonalen Transport, der für Proteine etwa 250-400 mm/Tag, für Bausteine des Zytoskeletts allerdings nur 0,25-1,0 mm/Tag beträgt, möglich ist (Rohen 2001). Der axonale Transport ist daher wesentlich für viele Funktionen der Nervenzelle und spielt eine entscheidende Rolle für den funktionellen bzw. strukturellen Erhalt der Axone. Der axonale Transport erfolgt in zwei Richtungen, *anterograd*: vom Perykarion zur Peripherie und *retrograd*: von der Peripherie zum Perikaryon (Tab. 1, Abb. 2).

Tabelle 1: Axonaler Transport in Nervenzellen.

Flußrichtung	Komponente	Transportmaterial	Geschwindigkeit (mm/Tag)
Anterograder Transport	langsame	Bauelemente von Neurotubuli	0,25 - 1,0
	mittelschnelle	Mitochondrien	10 – 40
	schnelle	Proteine, Glykoproteine, Lipide	250 - 400
Retrograder Transport	schnelle	Vesikel, Proteine	~200

Modifiziert nach Rohen 2001.

Die molekularen Motoren des axonalen Transports sind in drei Klassen eingeteilt, Myosine, Kynesine und Dyneine, deren mutierte Formen mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind (Millecamps und Julien 2013).

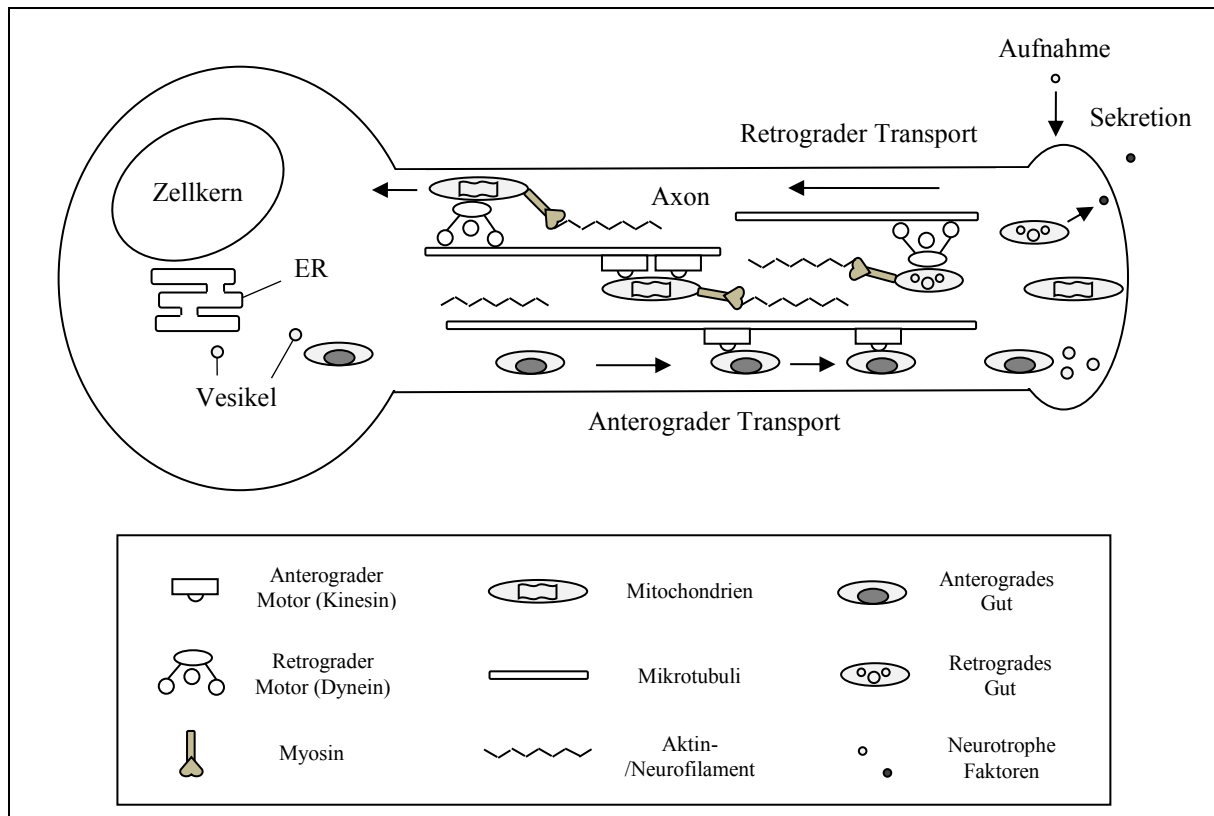


Abbildung 2. Modell zum molekularen Mechanismus des axonalen Transports mit den Motoren Kinesin, Dynein und Myosin und deren Interaktionspartnern, den Bestandteilen des Zytoskeletts. ER=endoplasmatisches Retikulum. Modifiziert nach Pasinelli und Brown 2006.

Durch die Darstellung des axonalen Transports wird die gegenseitige Abhängigkeit von Perikaryon und Axon deutlich und somit seine Wichtigkeit für den strukturellen und funktionellen Erhalt der Nervenzelle. Wird z.B. ein Axon durchgeschnitten, so geht es innerhalb kurzer Zeit zugrunde, weil es ohne ständigen Nachschub von Zellorganellen und zahlreichen Substanzen, die im Perikaryon hergestellt und in die Peripherie transportiert werden, nicht überleben kann (anterograde oder Waller'sche Degeneration). Umgekehrt ist aber auch das Perikaryon auf das Axon angewiesen, da es neurotropher (nervenernährender) Signale aus dem Zielorgan bedarf, um zu überleben. Nach einer Durchtrennung des Axons werden Reaktionen im Perikaryon ausgelöst (sog. retrograde Reaktion), die zu Verkümmern bzw. Absterben des Zellkörpers führen können.

Neben der mechanischen Durchtrennung des Axon kann auch eine ganze Gruppe von toxischen und metabolischen Ursachen sowie erblichen Faktoren zur Axondegeneration und somit zum Zelluntergang führen.

2.3 Erbliche Erkrankungen langer Axone

Axonopathien werden in die Gruppe der motosensorischen Erkrankungen eingeordnet, bei denen die Betroffenheit des oberen oder des unteren Motoneurons oder beider im Vordergrund des klinischen Bildes steht (Winkler und Ludolph 2004). Abzugrenzen sind diese motosensorischen Axonopathien von den Erkrankungen der Motoneurone deren Ursache primär im Zellsoma liegt, z.B. bedingt durch mitochondriale Funktionsstörung mit Vakuolisierung des Zellsomas, der Dendriten und proximalen Axone (z.B. amyotrophe Lateralsklerose (ALS)) (Boillee et al. 2006).

Hereditäre Axonopathien umfassen eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe der Motoneuron-Erkrankungen, deren gemeinsames pathologisches Merkmal die Degeneration der langen projizierenden Axone ist. Basierend auf klinischen Kriterien kann die Einteilung der hereditären Axonopathien in verschiedene Untergruppen erfolgen: familiäre Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), distale hereditäre motorische Neuropathie (dHMN), spinale Muskelatrophie (SMA), sensomotorische Neuropathie Typ 2 (HMSN II, axonaler Typ, Charcot-Marie-Tooth Typ 2 (CMT2)), hereditäre sensorische und autonome Neuropathie (HSAN) und spastische Paraplegie (HSP/SPG) (Züchner und Vance 2005).

Die neurologische Symptomatik hängt sehr stark vom primären Ort der Schädigung des Motoneurons ab. Klinische und somit symptomatische Heterogenität reicht von einer spastischen Paralyse und Hyperreflexie in HSP/SPG bis zu atonischer Paralyse, Atrophie und Hyporeflexie in dHMN, SMA und CMT2 (Züchner und Vance 2005). Die Einteilung der hereditären Axonopathien anhand der klinischen Symptomatik ist für die Diagnosestellung wichtig, spielt jedoch für die funktionelle Untersuchung verantwortlicher Gene bzw. Genprodukte eine untergeordnete Rolle.

Betrachtet als eigenständige Gruppe der hereditären Erkrankungen sind erbliche Axonopathien in ihrer Gesamtheit relativ häufig. Alle drei Vererbungsmuster (autosomal-dominant, autosomal-rezessiv, X-chromosomal) sind beschrieben worden. Sowohl genetische Heterogenität als auch heterogene intrazelluläre Proteinfunktionalität einzelner Gene wird in der Gruppe der hereditären spastischen Paraplegien besonders deutlich.

2.4 Hereditäre Spastische Paraplegien

Hereditäre spastische Paraplegien (HSP) sind als spastische Spinalparalysen (SSP) oder Strümpell-Lorrain Krankheit bekannt. Das Krankheitsbild ist erstmals im Jahr 1880 von Strümpell beschrieben worden (McDermott et al. 2000). Charakteristisches Leitsymptom der HSP ist eine langsam progrediente symmetrische spastische Muskeltonuserhöhung in den

unteren Extremitäten. Bei vielen Patienten kommt es im Krankheitsverlauf auch zu einer Harnblasenfunktionsstörung mit imperativem Harndrang. Nicht selten finden sich jedoch auch weitere akzessorische Symptome. Sehstörungen, Hörstörungen und/oder unregelmäßige zitternde Bewegungen sind das Resultat einer zentralen distalen Axondegeneration des kortikospinalen Traktes (*Tractus corticospinalis*) und der distalen zervikalen Anteile des medialen Hinterstrangs (*Tractus gracilis*) (Deluca et al. 2004).

HSP haben eine Prävalenz von ~7/100.000 (Silva et al. 1997). Sie können in Bezug auf das Vererbungsmuster oder den Phänotyp eingeteilt werden. Phänotypisch werden reine und komplizierte Formen der Erkrankung unterschieden, dabei beziehen sich die Begriffe auf das Fehlen und das Auftreten akzessorischer Symptome (Harding 1983, Depienne et al. 2007). Die Ausprägung der klinischen Symptomatik ist sehr variabel, sowohl bei verschiedenen Betroffenen innerhalb derselben Familie als auch im Vergleich zwischen unverwandten Patienten (Fink 2014). Erste Krankheitszeichen können in jedem Alter auftreten. Ein Häufigkeitsgipfel des Manifestationsalters findet sich vor dem 6. (frühe HSP Form) und ein zweiter zwischen dem 20. und 40. (späte HSP Form) Lebensjahr (Poeck und Hacke 2006).

Die HSP Therapie ist derzeit rein symptomatisch und beinhaltet vor allem physikalische Maßnahmen und die Hilfsmittelversorgung, und bei einigen Patienten pharmakologische antispastische Behandlung. Eine kausale Therapie gibt es derzeit nicht (Soderblom und Blackstone 2006, Fink 2013).

Genetisch betrachtet sind HSP sehr heterogen. Sie können dem autosomal dominanten, dem autosomal rezessiven oder selten einem X chromosomal rezessiven Erbgang folgen. Mittlerweile sind über 70 verschiedene Genloci und mehr als 55 mit HSP assoziierte Gene bekannt (Lo Giudice 2014).

2.5 Hereditäre spastische Paraplegie Typ SPG8

2.5.1 Klinik und Genetik

HSP Typ SPG8 ist eine klinisch reine, autosomal-dominant vererbte Form der hereditären spastischen Paraplegien mit relativ frühem Erkrankungsbeginn (Hedera et al. 1999, Rocco et al. 2000). Phänotypisch zeigen SPG8 Patienten schwere progrediente Beeinträchtigung der Motorik häufig begleitet von einer Harnblasenfunktionsstörung (Rocco et al. 2000, Valdmanis et al. 2007, de Bot et al. 2013a, de Bot et al. 2013b).

Im Jahr 1999 erfolgte die Kopplung zu dem Locus 8q23-24 auf Chromosom 8 und die Benennung zu HSP Subtyp SPG8 (Hedera et al. 1999). 2007 erfolgte durch Valdmanis et al (2007) die Identifizierung des in SPG8 mutierten Gens (*KIAA0196*). Insgesamt neun

KIAA0196 Gen-Varianten, die meisten vom *missense* Typ, sind mit dem Phänotyp der hereditären spastischen Paraplegien assoziiert (Tab. 2). *KIAA0196* kodiert für das Genprodukt Strumpellin Protein (Valdmanis et al. 2007).

2.5.2 Physiologisches und pathophysiologisches Umfeld von Strumpellin

KIAA0196 mRNA ist bei Menschen in allen Geweben exprimiert und besteht aus 29 Exonen (Clemen et al. 2010). Die Northernblot-Analyse am humanen Gehirngewebe der Kontrollpersonen und von Blutproben der SPG8 Patienten zeigte keine weiteren Strumpellin-Isoformen (Valdmanis et al. 2007). Die Immunoblot-Analysen demonstrieren die Präsenz von Strumpellin Protein in verschiedenen humanen Geweben wie z.B. zentralem Nervensystem, Skelettmuskulatur, Lunge, Dickdarm, Mastdarm und Magen (Clemen et al. 2010).

Tabelle 2: Mutationsspektrum in *KIAA0196*/Strumpellin assoziiert mit HSP.

Mutation	Konservierung	Klinische Form	Erbmuster	Literatur
p.I226T	100%	kompliziert	dominant	Bettencourt et al. 2013
p.N471D	100%	rein	dominant	Valdmanis et al. 2007
p.R583S	100%	rein	dominant	Ishiura et al. 2014
p.S591P	100%	rein	dominant	Wang et al. 2014
p.L619F	100%	rein	dominant	Valdmanis et al. 2007
p.V620A	100%	rein	dominant	Jahic et al. 2014
p.V626F	100%	rein	dominant	Valdmanis et al. 2007
p.G696A	100%	rein	dominant	de Bot et al. 2013
g.ex11-15del	100%	rein	dominant	Ishiura et al. 2014

„g.ex11-15del“=genomische Deletion (Exon 11 – Exon 14, Teil von Exon 15). Modifiziert nach Jahic et al. 2014.

Strumpellin ist evolutionär hoch konserviert, 1159 Aminosäuren lang und zeigt insgesamt wenig Homologie zu anderen Proteinen. Der „N-terminale“ Teil erstreckt sich über die ersten 240 Aminosäuren. Die zentrale Domäne besteht aus fünf „Spectrin-ähnlichen“ Einheiten, beinhaltet Aminosäuren 241 bis 791 und besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Proteinen Exo70 (11% Gleichheit) und Importin β -2 (11% Gleichheit). Der „C-terminale“ Teil von Strumpellin beinhaltet Aminosäuren 792 bis 1159 und zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit Proteinen Exportin-5 (14% Gleichheit) und Importin β -1 (7% Gleichheit) (Abb. 3) (Clemen et al. 2010).

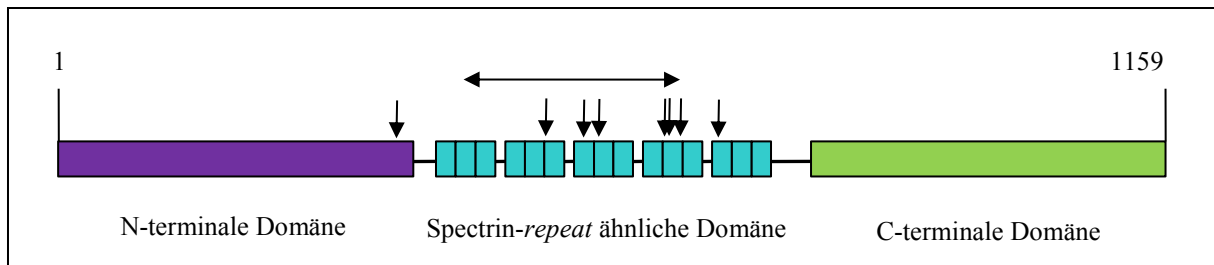


Abbildung 3: Schematische Struktur von humanem Strumpellin Protein. Aufrechte Pfeile stellen *Missense*-Varianten assoziiert mit HSP Typ SPG8 dar. Der horizontale Doppelpfeil zeigt eine *KILAA0196* Deletion (Exon 11 – Exon 14, Teil von Exon 15), ebenfalls assoziiert mit HSP Typ SPG8. Modifiziert nach Clemen et al. 2010 und Jahic et al. 2014.

Die bis dato erzielten Daten zum Mutationsmechanismus der pathogenen Strumpellin Varianten sind widersprüchlich. Zurzeit existieren zwei Hypothesen zu dem Mutationsmechanismus der HSP Typ SPG8: Haploinsuffizienz vs. dominant negativer Effekt. Das Ausschalten von Strumpellin im Zebrafisch führt zu Krümmung und Verkürzung des Fischkörpers sowie Herzvergrößerung, und bei gleichzeitiger Koinjektion humaner wildtyp *KILAA0196* mRNA wird dieser Phänotyp aufgehoben. Das zeigt, dass humane wildtyp *KILAA0196* mRNA ausreichend ist den Verlust Zebrafisch eigener mRNA zu kompensieren. Bei Koinjektion der mutierten humanen mRNA konnte dies nicht nachgewiesen werden, der oben beschriebene Fischkörperphänotyp blieb bestehen (Valdmanis et al. 2007, Clemen et al. 2010). Durch das Ausschalten von Strumpellin in kultivierten HeLa Zellen wurden Veränderungen von Zellorganellen/Zytoskelett im Sinne von Tubulibildung gezeigt (Harbour et al. 2012). Der Strumpellin *Knockout* in primären murinen Melanozyten resultiert in der Veränderung der Form und Größe von endosomalen Vesikeln (Tyrrell et al. 2016). Das Ausschalten von Strumpellin in kultivierten Neuroblastom-Zellen zeigte einen reduzierten Axonauswuchs (Clemen et al. 2010). Diese Zebrafisch- und zellbasierten biochemischen Phänotypen könnten für eine Haploinsuffizienz der pathogenen Strumpellin Varianten sprechen. Jedoch sind die Strumpellin Varianten hauptsächlich vom *missense* Typ. In einer weiteren Studie wurden Konstrukte mit diversen Strumpellin Varianten in primären Wildtyp Neuronen überexprimiert. Die o.g. morphologischen Veränderungen von Zellorganellen/Zytoskelett wurden nicht reproduziert (Freeman et al. 2013). Nichtsdestotrotz kann den *missense* Varianten einer autosomal dominanten Erkrankung häufig auch der dominant negative Effekt als ursächlicher Mutationsmechanismus zu Grunde liegen, der relativ gut mittels valider Mausmodelle untersucht werden kann (Garibyan et al. 2007).

Das Strumpellin Protein ist funktionell nur wenig charakterisiert. Strumpellin ist eine Komponente im WASH-Komplex, der mit dem Retromer-Komplex interagiert (Abb. 4) (Derivery & Gautreau 2010, Jia et al. 2010, Harbour et al. 2012).

Der WASH-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten, wobei folgende fünf als Hauptvertreter gelten: Wash1, Fam21, CCDC53, Swip (KIAA1033) und Strumpellin. Der WASH-Komplex vermittelt die Interaktion zwischen Zellorganellen und dem Zytoskelett. Dabei ermöglicht der WASH-Komplex unter Bildung von Aktinnetzwerk den Weitertransport vom Transportgut zu den verschiedenen subzellulären Stationen/Organellen. Zusammen mit dem Retromer-Komplex ist der WASH-Komplex für Bildung, Proteinausstattung und Transport von Vesikeln endosomaler Herkunft zuständig. Dies wird insbesondere eindeutig in der Erläuterung einzelner Schritte im Prozess der Endozytose. Angefangen bei der Aufnahme der einzelnen (extrazellulären) Moleküle mittels Rezeptor vermittelter Endozytose, über die Bildung der intrazellulären Transportvesikeln und derer Verschmelzung mit den Endosomen sowie den Weitertransport oder die Selektion einzelner Moleküle in verschiedene Richtungen (*trans*-Golgi, Lysosomen, Recycling zur Zelloberfläche) sind die Einzelkomponenten im WASH-Komplex dauernd der Bestandteil dieser komplexen intrazellulären biochemischen Abläufe (Abb. 4) (Seaman 2004, Bonifacino und Hurley 2008, Gomez und Billadeau 2009, Derivery et al. 2009, Seaman et al. 2013).

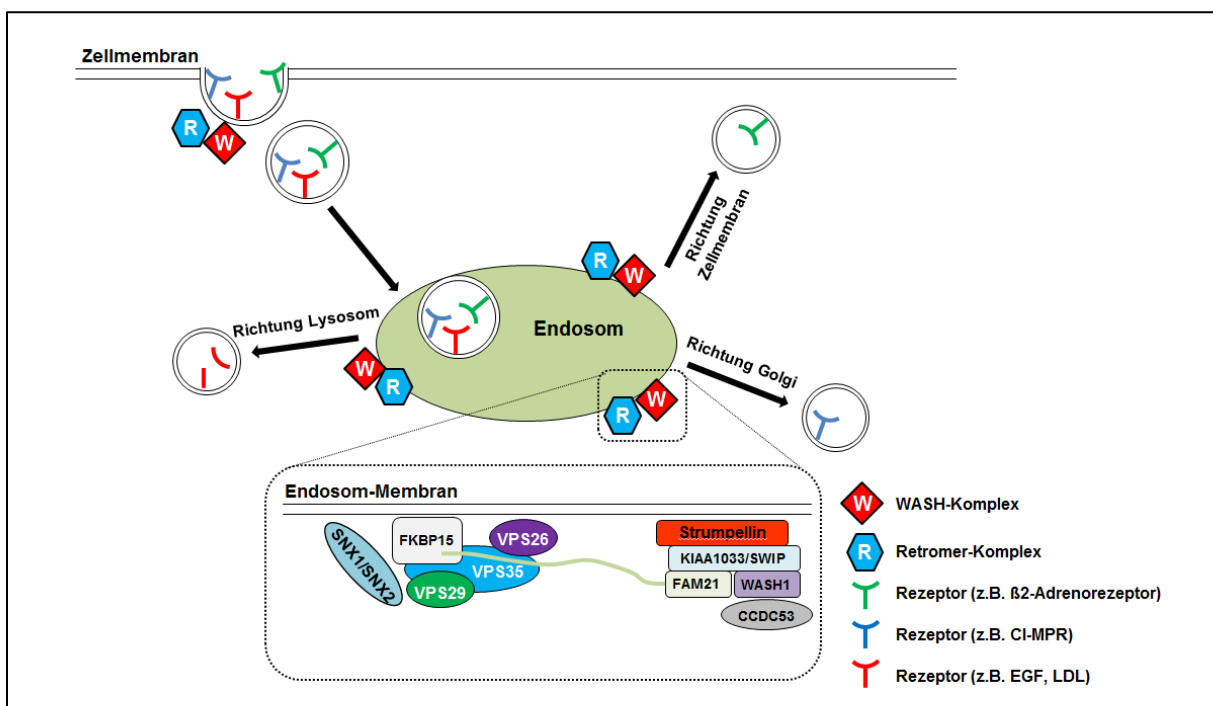


Abbildung 4: Schematische Darstellung der rezeptorvermittelten Endozytose, funktionelle Beteiligung von WASH- und Retromer-Komplex. Der WASH-Komplex beinhaltet die Proteine Strumpellin, KIAA1033 (Swip), Wash1, Fam21 und CCDC53. Strumpellin, Wash1 und Fam21 stehen im direkten Kontakt mit KIAA1033 während die Interaktion zwischen WASH- und Retromer-Komplex über eine Fam21 Restdomäne erfolgt. FKBP15, das Protein mit unbekannter Funktion, interagiert mit beiden, Retromer-Komplex und Fam21-Restdomäne. Der Retromer-Komplex besteht aus seinen drei Kernproteinen (VPS26, VPS29 und VPS35) und ist mit „Sorting Nexin“ Dimeren, kombiniert aus SNX 1 und SNX2 oder SNX5 und SNX6 (hier nicht dargestellt), assoziiert. Verschiedene Zelloberflächenrezeptoren können intrazellulär in verschiedene Richtungen (z.B. Zelloberfläche, Golgi-apparat ode Lysosomen) zwecks unterschiedlicher physiologischer Aufgaben weiterprozessiert werden.

Die Assoziation von WASH-Komplex mit Endosomen kommt durch das Retromer-Protein Vps35 zustande (Harbour et al. 2012). Das Ausschalten einzelner Untereinheiten im WASH-Komplex führt zur Bildung von tubulären für das SNX1 Protein positiven Strukturen an *early*-Endosomen. Dabei wurde eine gestörte Weiterleitung von endosomalem Transportgut wie z.B. Transferrin/-rezeptor oder β 2-Adrenorezeptor beobachtet (Derivery et al. 2009, Gomez und Billadeau 2009, Jia et al. 2010, Harbour et al. 2012, Freeman et al. 2013). In Zusammenspiel mit Retromer-Komplex regulieren einige Untereinheiten im WASH-Komplex (Wash1 und Fam21) über die Arp2/3 bedingte Polymerisierung und Verlängerung von Aktinfilamenten die Aktindynamik und somit das Aktinnetzwerk (Abb. 5) (Gomez und Billadeau 2009, Campellone und Welch 2010).

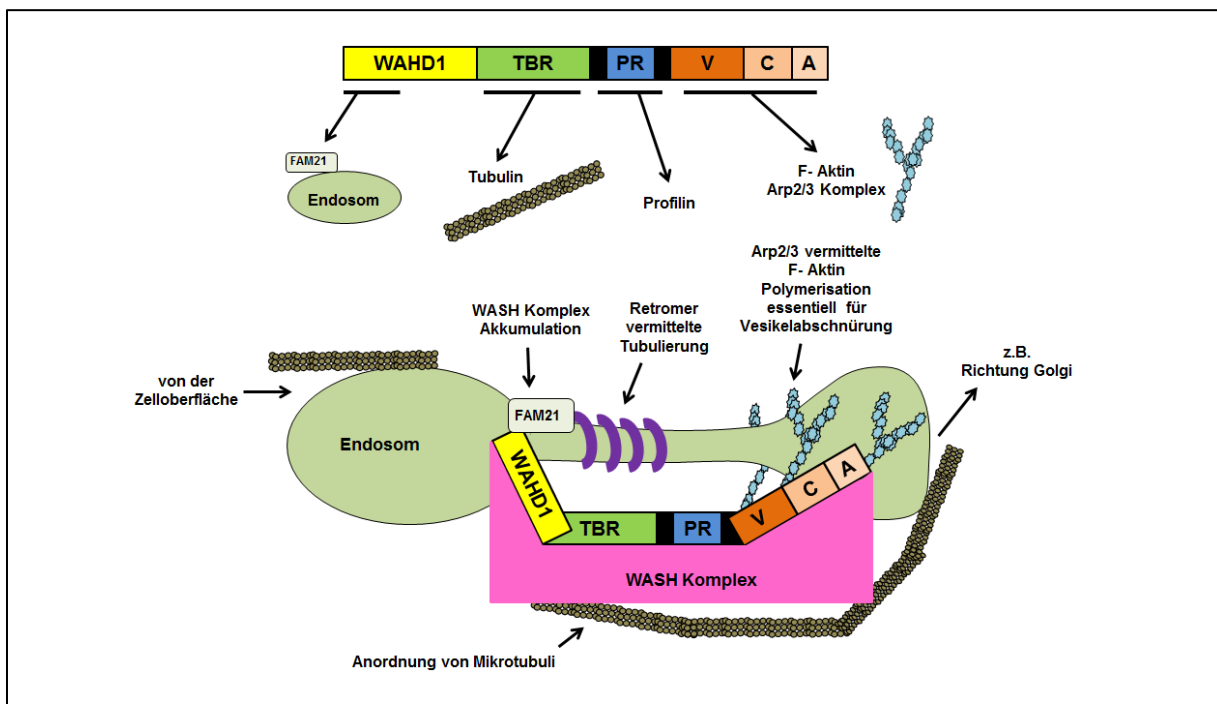


Abbildung 5: Funktionelle Architektur von WASH1. WASH Homologie Domäne, WAHD1; Tubulin bindende Region, TBR; Prolin reiche Region, PR; Verprolin-Connecting-Acidic Region; VCA. Der vermutete Mechanismus wie WASH und FAM21 gemeinsam den Retromer assoziierten Vesikeltransport regulieren. Modifiziert nach Gomez und Billadeau (2009).

Das Ausschalten von dem WASH-Komplex Hauptvertreter Wash1 führt zu dem Kollaps der endolysosomalen Kompartimente in Mausfibroblasten *ex vivo* (Gomez et al. 2012), und zur Deregulation der Autophagie (Xia et al. 2013, King et al. 2013, Zavodszky et al. 2014). Außerdem interagiert der WASH-Komplex mit einem weiteren an intrazellulärem Transport und Vesikelbildung beteiligten Proteinkomplex BLOC-1 (*biogenesis of lysosome-related organells complex-1*) (Ryder et al. 2013). Mutationen in den einzelnen Subeinheiten dieses oligomeren Proteinkomplexes sind mit dem Hermansky-Pudlak-Syndrom assoziiert (Bultema und Di Pietro 2013). Patienten mit Hermansky-Pudlak-Syndrom zeigen Hypopigmentierung,

gestörte Thrombozytenfunktion, Lungenfibrose, Immundefekte aber auch neurologische Symptomatik (Newell-Litwa et al. 2007, Raposo and Marks 2007, Raposo et al. 2007, Huizing et al. 2008, Dell'Angelica 2009, Wei and Li 2013).

Da Strumpellin der Bestandteil vom WASH-Komplex ist, kann angenommen werden, dass es einen Beitrag zu subzellulärem Vesikeltransport und/oder (Re-)Organisation des Zytoskeletts durch Beeinflussung des Aktinnetzwerks leistet.

Des Weiteren interagiert Strumpellin mit dem „*valosin-containing protein*“ (VCP) (Clemen et al. 2010). Die Mutationen in humanem VCP Gen sind mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Watts et al. 2004, Haubenberger et al. 2005, Guyant-Marechal et al. 2006, Gidaro et al. 2008, Bersano et al. 2009, Johnson et al. 2010, Fanganiello et al. 2011, Nalbandian et al. 2011). Dabei ist mutiertes VCP durch seine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen der Aggregatbildung sehr wichtig (Kakizuka 2008). Neuerlich wurden zwei Geschwister mit HSP Phänotyp und Mutation im VCP Gen beschrieben (de Bot et al. 2012). Diese Daten suggerieren ähnliche Pathomechanismen für diese beiden Proteine, Strumpellin und VCP.

3. Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der pathologischen Rolle von Strumpellin bzw. dem übergeordneten WASH-Komplex bei der HSP Typ SPG8 zu leisten.

Zugehörige Teilziele waren die Herstellung von zwei Strumpellin Mauslinien (*Knockin* einer als humanpathogen beschriebenen *missense* Mutation, klassischer *Knockout*), die phänotypische und histologische Charakterisierung der Linien, die umfassende Analyse ausgewählter Transkripte und Proteine in Hirnlysaten sowie zellbiologische Untersuchungen an primären Neuronen und primären Fibroblasten.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit benutzten Chemikalien entstammen den Chemikalienherstellern Sigma, Merck, Carl Roth, Roche, Qiagen, AppliChem, GE Healthcare, Invitrogen und Beckman Coulter. Die Enzyme von Firmen Invitrogen, New England Biolabs, Fermentas und Roche wurden benutzt. Die Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech bestellt. Die radioaktiv markierten Nukleotide wurden von Firma Hartmann Analytic verwendet.

4.1.2 Antikörper

Siehe Anhang.

4.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Siehe Anhang.

4.1.4 Grössenstandards

Siehe Anhang.

4.1.5 Vektoren

Für die Klonierung des Gen-Targeting-Vektors und die Generierung der Mauslinien wurden die in der Tabelle 3 aufgelisteten bakteriellen Vektoren benutzt.

Tabelle 3: Vektoren zu Klonierung des Konstrukts.

Vektor	Hersteller
pBluescript SK (+/-)	Stratagene
pKO Scrambler 901	Stratagene

4.1.6 Bakterienstämme und Mausstämme

Die Bakterienstämme und Mausstämme sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Bakterien- und Mausstämme zu Klonierung des Konstrukts und Generierung der Mäuse.

Bakterienstamm	Escherichia coli TOP ⁺ 10	Stratagene
Bakterienstamm	Escherichia coli XL1 blue	Stratagene
Mausstamm	Mus musculus (C57BL/6J)	SEK (Universitätsklinikum Jena)

4.2 Methoden

4.2.1 Mikrobiologische Methoden

4.2.1.1 Herstellung von chemokompetenten Bakterien

Zur Herstellung von chemokompetenten Bakterien wurde der Bakterienstamm E. Coli XL1 blue verwendet. E. Coli XL1 blue wurde in einer Übernachtskultur in 2 ml Ψ -broth Medium (LB-broth Medium, 4 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 3 μ g/ml Tetrazyklin) bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Am nächsten Tag wurden 500 ml Ψ -broth Medium mit 1 ml der Übernachtskultur verdünnt und im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,6 bei 37°C und 200 rpm weiter inkubiert. Anschließend erfolgte das Abkühlen der Bakterien für mindestens 10 min auf Eis. In einer vorgekühlten Zentrifuge (Beckman) wurden die Bakterien für 5 Minuten bei 4°C pelletiert (3000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 150 ml eiskaltem TFB1 Puffer (15 % Glycerin, 10 mM CaCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, pH 5,8 mit CH₃COOH einstellen) vorsichtig gelöst, resuspendiert und 60 Minuten auf Eis in TFB1 inkubiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (3000 rpm), der Überstand verworfen und das Sediment in eiskaltem TFB2 Puffer (15 % Glycerin, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl) durch langsames Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Einzelne Bakteriensuspensionen wurden vereinigt, zu jeweils 250 ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden die Aliquots bei -80°C gelagert. Verwendete Materialien waren steril filtriert.

Die Bakterienkompetenz wurde durch Transformation mit jeweils 20 pg des Plasmids pUC19 (Invitrogen) getestet und mittels Auswählen der Kolonien bestimmt. Die Kompetenz betrug ca. 10⁷ colony-forming units pro μ g DNA.

4.2.1.2 Transformation von chemokompetenten Bakterien

Ein 50 μ l Aliquot chemokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 4 μ l des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 40 Sekunden unterzogen und anschließend auf Eis für 2 Minuten abgekühlt. Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7,0) erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C und 300 rpm. Danach wurden die Bakterienzellen 5 Minuten pelletiert (4000 rpm), 250 μ l Überstand abgenommen, die Bakterienzellen in den verbliebenen 50 μ l resuspendiert und auf LB-Platten (10 g/l Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar) mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C 10 bis 16 Stunden inkubiert.

4.2.1.3 Screening einer Lambda - Bibliothek

Für die Klonierung der Gen-Targeting-Vektoren zur Generierung von genetisch modifizierten Mäusen über homologe Rekombination werden genomische Maus-DNA Fragmente von 15-25 kb benötigt. Solche DNA Fragmente werden aus einer Phagen-Bibliothek gewonnen, dabei ist das gesuchte DNA Fragment in das Phagengenom integriert und von Phagenarmen flankiert.

Um an das gewünschte genomische Maus-DNA Fragment zu gelangen, wurde eine Lambda Phage-Bibliothek (Lambda FIX II, Stratagene) durchmustert (engl. *Screening*). Das Screening basiert auf einem Stempel- bzw. Transduktionsprinzip. Der Transduktionsmix bestehend aus Phagen und Bakterien wurde auf Platten mit Nährmedium über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend der Stempel, d.h. DNA-Transfer auf eine Nylon-Membran, gezogen. Die Membran wurde dann auf eine bestimmte DNA Sequenz über DNA Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde durchsucht. Nachdem ein Phagenklon mit gesuchter DNA Sequenz identifiziert wurde, erfolgte die Anreicherung zurückgebliebener Phagen auf der Platte, mit anschließender Isolierung des gesuchten DNA Fragments und dessen Klonierung in Bakterien.

Zur Phagenvermehrung wurden E. coli XL-1 blue MRA Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden in 100 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 unter Schütteln bei 37°C angezüchtet. Die Kultur wurde dann auf zwei Falcons je 50 ml aufgeteilt und 15 Minuten bei 4°C pelletiert (3000 rpm). Diese Zeit wurde für die Herstellung von 10 mM MgSO₄ genutzt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in insgesamt 20 ml 10 mM MgSO₄ gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der neuentstandene Überstand wurde abgenommen und das Pellet in insgesamt 20 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und bei 4°C bis zu zwei Wochen gelagert.

Das Screening der Lambda-Bibliothek wurde in zwei Schritten unter Verwendung von Platten unterschiedlicher Größe durchgeführt. 150 mm Platten wurden für das Ausplattieren der Phagenbibliothek und für die präparative Isolation eines Phagenklons mit gesuchter Sequenz genomischer Maus-DNA verwendet. 90 mm Platten wurden für die Anreicherung von Phagenklonen mit gesuchter Sequenz genomischer Maus-DNA verwendet. 450 µl (150 mm Platte) und 150 µl (90mm Platte) der MRA-Bakteriensuspension wurden mit der Phagenbibliothek für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der Transduktionsmix in 9 ml (150 mm Platte) bzw. 3 ml (90 mm Platte) bei 47°C vorgewärmten Top-Agars (Agarose 1%) gegeben, vorsichtig unter Vermeidung der Luftblasenbildung vermischt und auf Platten entsprechender Größe gleichmäßig ausplattiert. Die Platten wurden

15 min bei Raumtemperatur Luft getrocknet und anschließend bei 37°C als Übernachtskultur im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag, vor dem Filterziehen bzw. Stempeln, wurden die Platten zunächst bei Raumtemperatur für 30 min, dann bei 4°C für mindestens 2 Stunden abgekühlt. Zum Stempeln wurde eine Nylon-Membran mit einem Durchmesser von 132 mm (150 mm Platte) bzw. 82 mm (90 mm Platte) benutzt. Je Platte wurden zwei solche Membranen, zunächst Original-Membran (A), dann Replika-Membran (A'), auf entsprechende Platte für 1-2 min gelegt und zur Orientierung drei Markierungen in asymmetrischen Abständen aus dem Agar und der Membran ausgestochen. Nach der Inkubationsphase von 1-2 min wurden die Membranen vorsichtig von der LB-Platte abgezogen und mit der DNA Seite nach oben auf Filterpapier mit Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) für 2 min gelegt. Danach wurden die Membranen auf einen Filterpapier getränkt mit Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 8,0) überführt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für mindestens 1 min im Waschpuffer (0,2 M Tris, 2x SSC) inkubiert. Danach wurden die Membranen Luft getrocknet und die DNA 2 Stunden bei 80°C gebacken und somit auf den Membranen fixiert.

Um Phagen mit gesuchtem Fragment genomischer Maus-DNA zu detektieren, wurden die Membranen mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Ein Röntgenfilm (BioMax MR Kodak) wurde für mindestens 2-3 Tage auf Original- und Replika-Membran gelegt und entwickelt. Die Filme wurden dann ausgeschnitten, übereinandergelegt und übereinstimmende Signale markiert, wobei die Signale der Replika-Membranen schwächer sein sollen. Auf einem UV-Lichttisch wurden die LB-Platten auf den ausgeschnittenen Film in der richtigen Orientierung gelegt, einzelne Klone samt LB-Agar mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 ml Tris-HCl pH 7,5, 5 ml 2 % Gelatine in 1 l H₂O) mit 20 µl Chloroform überführt und nach Vortexen über Nacht im Kühlschrank (4°C) inkubiert.

In der zweiten Screening-Runde erfolgte die Vereinzelung ausgestochener Phagenklone auf 90 mm Platten. Aus dem Überstand ausgestochener Klone der ersten Screening-Runde wurde eine Verdünnung (1:1000) mit SM-Puffer hergestellt und von dieser Verdünnung jeweils 1 µl, 10 µl und 100 µl mit 150 µl MRA-Bakterien 20-30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Der Phagen-Bakterien-Gemisch wurde in 3 ml (90 mm Platte) bei 47°C vorgewärmten Top-Agars (Agarose, 1%) gegeben und vorsichtig 2-3 mal unter Vermeidung der Luftblasenbildung geschwenkt und auf vorgewärmten LB-Platten gleichmäßig verteilt. Dabei ist zu beachten, dass die LB-Platten warm bleiben, da der Top-Agar auf zu abgekühlten

Platten zu schnell fest wird. Danach wurden die Platten unter der Sterilbank mindestens 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten auf Phagenplaques untersucht und die Platten, die nur eine geringe Anzahl an Phagenplaques enthielten, wurden gestempelt. Danach erfolgte die DNA Hybridisierung und Detektion einzelner Phagenklone. Das Screening wurde so lange fortgesetzt, bis man einzelne Phagenplaques einzelnen Sondensignalen zuordnen konnte. Sobald einzelne Phagenklone vorlagen, konnten der Titer der Phagensuspension bestimmt und eine Präparation der Phagen-DNA von 150 mm Platten durchgeführt werden.

4.2.2 Klonierungsmethoden

4.2.2.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen kommen natürlicher Weise in Bakterien vor und haben als Aufgabe Fremd-DNA anzugreifen und sie zu inaktivieren. Sie erkennen spezifische palindrome Basensequenzen im DNA-Doppelstrang wobei jeder der beiden Stränge innerhalb oder neben der Erkennungssequenz gespalten wird. Infolge dessen entstehen DNA-Fragmente mit definierten Enden. Wird während der enzymatischen Spaltung ein Basen-Überhang produziert, spricht man von klebrigen Enden (engl.: *sticky ends*), während die Enden ohne Basen-Überhang als glatte Enden (engl.: *blunt ends*) definiert werden.

Die Aktivität von Restriktionsenzymen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µg einer bestimmten DNA unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde vollständig zu verdauen. Um einen vollständigen Verdau zu erreichen, wurden 1-2 µg Vektor und 5 µg Insert in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer unter Zugabe von 10 U entsprechender Restriktionsenzyme über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Ausnahme war die Restriktionsverdau mit *EcorI*, hierbei wurde die Verdau schon nach einer Stunde beendet. Dabei betrug das Reaktionsvolumen mindestens das Zehnfache des Volumens zugegebener Enzymlösung.

Die Restriktionsverdau von ES-Zellen DNA bzw. genomischer DNA (5-10 µg) erfolgte mit 20-30 U Enzym bei entsprechender Temperatur (meistens 37°C) über Nacht. Am nächsten Morgen wurden noch 10 U entsprechenden Enzyms dazugegeben und der Restriktionsmix für eine weitere Stunde unter optimalen Bedingungen inkubiert.

4.2.2.2 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden und Dephosphorylierung

In Abhängigkeit von eingesetzten Restriktionsendonukleasen werden während der enzymatischen DNA-Spaltung Fragmente mit zum Teil einzelsträngigen Überhängen

produziert. Solche Fragmente zeigen bei der Ligation mit einem glatt verdauten Vektor eine niedrige Ligationseffizienz.

Um die Ligationseffizienz solcher inkompatiblen DNA-Enden zu erhöhen wurden überhängende DNA-Enden mit Hilfe einer T4 DNA-Polymerase aufgefüllt. Erstens wurden die Restriktionsenzyme im Restriktionsmix durch Erhitzen bei 65°C oder 80°C 20 min lang inaktiviert und durch darauffolgende Lagerung auf Eis abgekühlt. Zum Auffüllen überhängender DNA-Enden wurden 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl T4 DNA-Polymerase zum Restriktionsmix dazu pipettiert und das Gemisch 20 min bei 11°C inkubiert. Anschließend wurde die T4 DNA-Polymerase bei 75°C 20 min lang inaktiviert.

Um eine ungewollte Religation von einfach verdauter oder unvollständig mit zwei verschiedenen Enzymen verdauter Vektor-DNA zu unterbinden, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen linearisierter Vektoren entfernt. Hierfür wurde eine alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, *Calf Intestin Phosphatase*) verwendet. Die Dephosphorylierung erfolgte direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau indem der Restriktionsmix zunächst 20 min lang durch Erhitzen bei 65°C inaktiviert wurde. Danach wurde 1 µl der alkalischen Phosphatase dazu pipettiert und der Reaktionsansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Erhitzen auf 75°C. Danach wurde die dephosphorylierte Vektor-DNA über ein Agarose-Gel aufgereinigt und mit entsprechendem DNA-Fragment einer Fremd-DNA ligiert.

4.2.2.3 Elektrophorese auf Agarosegel

Unter Anwendung einer horizontalen Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße aufgetrennt und somit identifiziert werden. Die Nukleinsäuren sind negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Dabei wirkt das Agarosegel wie ein Sieb, das bedeutet: bei konstanter Spannungsintensität wandern kleine DNA-Moleküle schneller als Große. Die Laufgeschwindigkeit der Moleküle hängt weiterhin von der Agarosegel-Konzentration ab.

In dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 0,5-2,0 % eingesetzt, dabei erfolgte die Separation kleiner Fragmente in höher konzentrierten Gelen, während große Fragmente in niedrig konzentrierten Gelen aufgetrennt wurden. Um ein Gel herzustellen, wurde eine bestimmte Agarosemenge abgewogen, die in entsprechendem Volumen 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) im Mikrowellenherd aufgeschmolzen wurde. Nach kurzem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das flüssige Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in eine Gelwanne gegossen. Die entstandenen Luftblasen wurden

mittels einer Pipettenspitze entfernt und ein Gelkamm zum Aussparen der Geltaschen eingesetzt. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Gelkammer gelegt. Zu den Proben wurde 1x DNA-Ladepuffer (6x DNA-Ladepuffer: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) zugesetzt und das Gel mit dem Gemisch beladen. Parallel zu den Proben wurde ein Größenmarker, der DNA-Bruchstücke definierter Länge enthält und zur Bestimmung der Fragmentgrößen dient, in eine Geltasche aufgetragen und anschließend eine Spannung von 30-150 V angelegt. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurde eine Laufzeit von 30 min bis 16 Stunden gewählt. Aufgrund interkalativer Eigenschaften von fluoreszierendem Ethidiumbromid erfolgte das Sichtbarmachen der DNA-Fragmente unter UV-Licht, dabei erschienen Nukleotidfragmente als rötliche Banden.

4.2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Verknüpfung eines linearisierten Vektors mit einem Insert wurde eine T4-DNA Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA.

Die Ligation wurde nach folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Vektor-DNA	x µl
Insert-DNA	x µl
Ligationspuffer (10x)	2 µl
T4-DNA Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Die Ligationseffizienz hängt von dem Verhältnis Vektor zu Insert ab. Das molare Vektor zu Insert Verhältnis von 1:3-1:9 wurde angestrebt. Aufgrund der technischen Messungenauigkeit der relativ kleinen DNA-Mengen wurde in dieser Arbeit auf eine Konzentrationsbestimmung der Vektor- und Insert-DNA verzichtet. Stattdessen wurden Ligationsansätze mit drei verschiedenen Mengen an Insert (1 µl, 3 µl und 6 µl) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag wurden von jedem Ansatz 4 µl in chemokompetente Bakterien transformiert.

4.2.2.5 Sequenzierung

Zur Konstrukt-Generierung wurden mehrere verschiedene Inserts wie z.B. Mutageneseprodukt inklusive *Missense*-Mutation, *LoxP*-Sequenzen, *Neo*-Kassette flankiert von *FRT*-Sequenzen in den Gen-Target-Vektor reinkloniert. Vorausgesetzt richtige 5'-3' Orientierung der Inserts wurde der fertige Konstrukt in die ES-Zellen zur Erzeugung der *knockin* und *knockout* Linien elektroporiert.

Für die Klonierung verwendeten Schnittstellen, die Insert-Orientierung als auch der spätere Nachweis von *knockin* und *knockout* Mäusen wurden auf ihre DNA-Basenabfolge untersucht. Für die Sequenzierung von Mutageneseprodukt, *LoxP*-Sequenzen und einem Teil der *Neo*-Kassette wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte mit spezifischen Primern flankiert und mittels PCR vervielfältigt. Für den eigentlichen Sequenzierungsschritt wurden PCR-Produkt (1 µl) und das entsprechende Primer (1 µl) gemischt und mit ddH₂O auf 15 µl Volumen aufgefüllt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Kapillarsequencer der Firma Beckman Coulter (Seriennummer: CEQ 8000 : 306 6877) entsprechend den Herstellerangaben. Die dazu benötigten Reagenzien wurden von dem gleichnamigen Hersteller bezogen. Das Ablesen einzelner Sequenzen erfolgte durch die Farbenzuordnung von schwarz, grün, rot und blau den einzelnen DNA-Basen, nämlich G, A, T und C.

Die Sequenzierung zum Nachweis der *knockin* und *knockout* Linien erfolgte jedoch bei dem kommerziellen Anbieter *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, Deutschland).

4.2.3 Isolation und Aufreinigung der Nukleinsäuren

4.2.3.1 Mini-Präparation der Plasmid-DNA

Für die Isolation der Plasmid-DNA wurden Bakterienklone in 3 ml (Miniprep) LB-Medium mit Antibiotikum (50 mg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler (180 rpm) wachsen gelassen. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden in ein neues Eppendorf-Tube überführt, abzentrifugiert und das Bakterien-Pellet in 100 µl Puffer P1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) wurde mehrmals vorsichtig invertiert und 3-5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von Puffer P3 (300 g/l Kaliumacetat, 11,5 % Essigsäure) wurde die Lyse gestoppt, und die Ansätze erneut mehrmals vorsichtig invertiert und auf Eis für 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation, 5 min bei 14000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Nach Zugabe von 900 µl 100%-em Ethanol und vorsichtigem Mischen wurde die DNA ausgefällt und im erneuten Zentrifugationsschritt (5 min, 14000 rpm) pelletiert. Der Überstand wurde

abgenommen und das DNA-Pellet einmal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, danach bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20-40 µl ddH₂O gelöst.

4.2.3.2 Midi-Präparation der Plasmid-DNA

Zur Isolation größerer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben verwendet.

4.2.3.3 Isolation der DNA aus Phagen

Für die Aufreinigung der genomischen Maus-DNA aus einem Lambda-Phagen-Klon wurden drei gut durchlysierte Platten (150 mm) mit 1-2 mm großen Plaques verwendet. Nach einer Übernachts-Inkubation (37°C) wurden die Platten ca. 2 Stunden lang bei Raumtemperatur abgekühlt, jeweils mit 11 ml SM-Puffer überschichtet, mit Parafilm abgeklebt und wieder über Nacht im Kühlraum (4°C) langsam schwenken gelassen. Am nächsten Tag wurde der Überstand aller drei Platten in einem 50 ml Reaktionsgefäß vereinigt, 1 ml Chloroform dazu gegeben und durch das kräftige Vortexen gemischt. Die entstandenen bakteriellen Zelltrümmer wurden bei 4°C pelletiert (15 min, 5000 g) und mit 25 ml Überstand wurde ein Zentrifugengefäß (Ultraclear SW28-Tube, Beckman) beladen. Daraufhin wurde mit 3 ml CsCl-Lösung (3M in SM-Puffer) und mit 5 ml CsCl-Lösung (5M in SM-Puffer) unterschichtet. Zum Unterschichten wurde die automatische Pipette auf „langsamen Auslauf“ eingestellt und immer etwas mehr Puffer aufgezogen als nötig, so dass man die Pipette nicht vollständig auslaufen lassen musste. Dadurch wurde das Ausstoßen der Luftblasen aus der Pipette vermieden und die Vermischungsgefahr der Gradienten reduziert. Die Zentrifugengefäße wurden mit dem phagenhaltigen Überstand aufgefüllt und austariert. Nach einem Zentrifugationsschritt (SW28-Rotor, 25000 rpm, 2 Stunden, 20°C) in einer Ultrazentrifuge (Beckman) wurde die untere Gradientenbande mit den Lambda-Phagen zwischen der 3 M und 5 M CsCl-Lösung mit einer Spritze (2 ml; 0,9 ml Kanüle) in möglichst kleinem Volumen langsam abgezogen, in einen Falcon pipettiert und auf 2,5 ml mit 5 M CsCl in SM-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 ml gesättigter CsCl-Lösung in SM Puffer. Das Gemisch wurde in ein Zentrifugengefäß (Ultraclear SW40-Tube, Beckman) überführt, mit 3,5 ml CsCl-Lösung (5 M in SM-Puffer) und 4,5 ml CsCl-Lösung (3 M in SM-Puffer) überschichtet und in dem SW40-Rotor der Ultrazentrifuge (Beckman) 90 min bei 20°C zentrifugiert (35000 rpm). Die untere Bande mit den Lambda-Phagen wurde mit einer Spritze (1 ml; 0,9 mm Kanüle) in einem möglichst kleinen Volumen (600-900 µl) durch das Durchstechen des Zentrifugengefäßes abgezogen und das abgenommene Volumen auf

mehrere Reaktionsgefäße (1,5 ml) zu je 150 µl aufgeteilt. 15 µl Gemisch bestehend aus 2 M Tris-HCl und 0,2 M EDTA, pH 8,5 und 150 µl von deionisiertem Formamid wurden zu den 150 µl der Phagensuspension in CsCl dazu gegeben. Die Proben wurden gemischt und bei RT mindestens 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl H₂O und 900 µl Ethanol wurde die Phagen-DNA bei -20°C über Nacht gefällt. Gefällte DNA wurde mit Hilfe einer Glaskapillare rausgefischt, in 70 %-igem Ethanol gewaschen, bei RT kurz getrocknet und in insgesamt 150 µl „low“ TE über Nacht bei 4°C gelöst.

4.2.3.4 Isolation der DNA aus Agarosegelen

Durch UV-Beleuchtung wurden die DNA-Fragmente spezifischer Länge im Agarosegel sichtbar gemacht, mittels eines Skalpells auf dem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Europe, Deutschland) wurde zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

4.2.3.5 Aufreinigung der DNA für die Embryonalstammzell- (ES-)Zellkultur

Für die Elektroporation des Gen-Targeting-Vektors in die embryonalen Stammzellen zur homologen Rekombination wurde linearisierte DNA in höchster Reinheit benötigt. Hierfür wurden 80-100 µg aufgereinigter DNA mit 80-100 Einheiten des Restriktionsenzym (*NotI*) in einem Endvolumen von 250 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Zur Erhöhung der Verdaueffizienz wurden der angesetzten Verdau am nächsten Morgen zusätzlich 10-20 Einheiten des gleichen Enzyms zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und für weitere 2 Stunden bei 37°C verdaut. Zur Kontrolle der kompletten Linearisierung des Konstrukts wurden 2 µl der Verdaureaktion auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach erfolgreicher Enzymverdau der DNA wurde der Reaktionsansatz mit ddH₂O auf 500 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 1 Volumenanteil TE-gepuffertes Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (25:24:1) durch Vortexen gemischt. Die DNA Probe wurde 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (13000 rpm), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zwei Mal mit Chloroform-Isoamylalkoholgemisch (24:1) zur Phenolentfernung gewaschen. Die DNA Fällung erfolgte durch Zugabe von 1 Volumenteil von Isopropanol und 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat pH 5,2. Die gefällte DNA wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in HPLC-H₂O über Nacht gelöst. Die Messung der DNA Konzentration erfolgte Photometrisch am Gerät NanoDrop

(Thermo Fisher Scientific, USA) entsprechend den Herstellerangaben. 1 µg linearisierter DNA wurde mittels Gelelektrophorese auf die erfolgreiche Verdau überprüft.

4.2.3.6 HotSHOT Extraktion genomischer DNA aus Schwanzspitzen der Maus

Für die Analyse genomischer Maus-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ausschließlich die schnelle „HotShot“ DNA-Extraktionsmethode angewendet. Hierfür wurden die Schwanzbiopsien (0,2-0,3 cm) entnommen und in 75 µl alkalischem Lysepuffer (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12.0 ohne Einstellen) bei 95°C 40 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die einzelnen Proben auf Eis abgekühlt (5 min) und mit 75 µl Raumtemperiertem Neutralisationspuffer (40 mM Tris-HCl, pH 5.0 ohne Einstellen) versetzt und durch kurzes Vortexen gemischt. Anschließend wurde 1 µl extrahierter Maus DNA in einem PCR-Ansatz verwendet, das Restvolumen wurde bei 4°C gelagert.

4.2.3.7 Isolation der RNA und Überprüfen der RNA-Qualität

Die RNA-Isolation erfolgte ausschließlich aus dem Gehirngewebe der Maus. Die Tiere wurden durch die Stickstoffintoxikation getötet, das Gehirn herauspräpariert und durch einen mittleren Sagitalschnitt halbiert. Anschließend wurde das Gewebe im flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bis zu dem Tag der RNA Isolation bei -80°C in der Alufolie aufgehoben. Am Tag der RNA Isolation wurden ca. 20-30 mg Gewebe einer Gehirnhälfte entnommen und mit RNeasy Mini Kit (Qiagen) unter Verwendung des Hersteller-Protokolls wurde die RNA isoliert. Aufgrund allgegenwärtiger Nukleasen (z.B. RNAsen) wurde die Qualität der gewonnenen RNA überprüft. Dies erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Eine schnelle Methode diente der RNA Qualitätskontrolle. Dafür wurden 1%-ige Agarose-Flachbett-Gele verwendet. Das Gemisch bestehend aus 1 µl RNA-Probe und 2 µl Ladepuffer wurde auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 90 V für maximal 15 min. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Proben mit der „guten“ RNA Qualität bzw. der intakten RNA zeigten jeweils zwei Banden entsprechend 28S und 18S der ribosomalen RNA, die ca. 80 % der Gesamt-RNA ausmacht (Palmer und Prediger, Life Technologies). Die Proben mit der „schlechten“ RNA Qualität zeigten entlang der gesamten Laufstrecke eine verschmierte Bande und wurden für die weiteren Analysen nicht verwendet.

4.2.4 Molekularbiologische Methoden

4.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, PCR (engl. *Polymerase chain reaction*), wird zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA Fragmenten spezifischer Länge verwendet. Das Prinzip der DNA-Vervielfältigung (eng. *amplifikation*) besteht dabei aus drei Schritten:

- Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 95°C
- Anlagerung (eng. *annealing*) von zwei Oligonukleotidprimern an die einzelsträngige DNA bei spezifischer Anlagerungstemperatur der Primer
- Elongation der Primer und Synthese eines komplementären DNA-Stranges mit Hilfe eines hitzestabilen Enzyms

In dieser Arbeit wurde die PCR bei der Herstellung von DNA-Fragmenten zur anschließenden Klonierung, der Ligations- und Transformationskontrolle sowie für die Genotypisierung von Mäusen und Embryonen verwendet. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine Taq-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Die PCR wurde meistens in einem 20 µl Volumen angesetzt. Dabei wurden 1 µl genomischer DNA (0,1-1 µg), 1 Volumenteil des Reaktionspuffers (Invitrogen), 10 pmol von jedem Primer, 0,5 mM von jedem dNTP (Invitrogen) und 0,1 µl der Polymerase gemischt und mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt.

Die Reaktion erfolgte in der PCR-Maschine *Mastercycler Personal* der Firma Eppendorf (Deutschland). In der Tabelle 5 ist ein Standard-PCR-Protokoll dargestellt. Die Primer spezifische Anlagerungstemperatur und die Elongationszeit wurden für jedes Primerpaar bei der Primerbestellung berücksichtigt.

Tabelle 5: Standard-PCR-Protokoll.

Schritte	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 Minuten	1
Denaturierung	95°C	15 Sekunden	35
Anlagerung	55-60°C	15 Sekunden	35
Elongation	72°C	30 Sekunden	35
	4°C	∞	

4.2.4.2 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA aus Gehirngewebe wurde isoliert und anschließend unter Verwendung von Random Hexamer Primer und Superscript III Kit (Invitrogen, USA) entsprechend den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

4.2.4.3 Quantitative PCR (qPCR) und entsprechendes Primerdesign

Für die qPCR wurden 30 mg Hirncortex in einem Glasmixer händisch homogenisiert und die Gesamt-RNA mit RNeasy Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben seitens Dissertationsverfassers isoliert. Der qPCR-Reaktionsmix wurde von Frau Betina Rudolph (AG Frahm, Klinik für Neurologie, UKJ) angesetzt. Der qPCR-Reaktionsmix betrug 20 µl und bestand aus Brilliant® II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, La Jolla, Kanada), cDNA (entspricht 25 ng umgeschriebener RNA) und Reaktionsprimern (Endkonzentration 250 nM). Die eigentliche Amplifikation der Transkripte erfolgte mit Rotor Gene 6000 (Corbet Life Science, jetzt Qiagen) Gerät. Die Expression bzw. die Transkriptmenge einzelner Gene wurde mit Hilfe des mathematischen Modells nach Pfaffl (Pfaffl 2001) seitens Nadine Jänisch (AG Frahm, Klinik für Neurologie, UKJ) berechnet. Die cDNA-Sequenzen untersuchter Gene wurden von Genome Browser (Santa Cruz, USA) heruntergeladen und die spezifischen Primer mit Hilfe der Primer3-Software designet.

4.2.4.4 Westernblot

Für den Westernblot wurden Gehirnhemisphären einzeln in dem Lysepuffer RIPA samt Proteaseinhibitor cOmplete (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) homogenisiert und anschliessend bei 13200 rpm für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand (10 µl) wurde auf ein Polyacrylamidgel (10%) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran PROTRAN (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) transferiert. Die Blots wurden mit entsprechenden Antikörpern beladen, ein sekundärer Antikörper diente zur Darstellung einzelner Proteinbanden. Die einzelnen Banden wurden mittels Standarddensitometrie quantifiziert.

4.2.4.5 Southernblot

Die DNA aus ES-Zellen wurde mittels Southernblot-Methode analysiert. Dabei wurden 10 bis 15 µg DNA mit entsprechendem Enzym (20-30 Einheiten) über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag wurde dem Verdaugemisch noch eine Enzymeinheit dazugegeben und für eine weitere Stunde verdaut. Der Größenmarker und das Verdaugemisch wurden auf ein Agarosegel (0,8 %) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Der gewünschte Gelabschnitt wurde ausgeschnitten, drei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 0,25 M HCl inkubiert (15 min). Das Gel wurde erneut mit destilliertem Wasser gewaschen und in 0,4 M NaOH equilibriert (15 min). Danach wurde ein Kapillarblot mit 0,4 M NaOH gebaut und auf eine Nylonmembran (Hybond XL, GE Healthcare) über Nacht bei Raumtemperatur geblottet.

Zur Immobilisation der DNA wurde die Membran bei 80°C gebacken (120 min) und vor der Hybridisierung mit radioaktivmarkierter Sonde mit 2x SSC gewaschen.

4.2.4.6 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit ³²P und Membran-Hybridisierung

Für die Markierung der DNA- Sonde wurde das ³²Posphor verwendet. Die 25-50 ng der Sonde, ein Plasmid DNA Fragment, wurden in 45 µl TE Puffer gelöst und bei 100°C denaturiert (5 min). Um die DNA-Sonde als Einzelstrang zu halten wurde das Puffergemisch auf Eis inkubiert (5 min). Das Puffergemisch wurde in ein Rediprime II-Gefäß (GE Healthcare, USA) mit 34 dATP, dTTP, dGTP, dCTP und DNA Polymerase überführt und zu der Reaktion wurden 5 µl ³²P dazu pipettiert. Im Anschluss wurde der Reaktionsmix bei 37°C inkubiert (30 min).

Um die unspezifischen Bindungen der radioaktivmarkierten Nukleotide zu minimieren, wurde der Mix über die Säule (GE Healthcare, USA) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Die Effektivität der radioaktiven Markierung der DNA Sonde wurde an einem Mixaliquot (1 µl) mittels Szintillationsgerät (Beckman) gemessen.

Zur weiteren Reduktion der unspezifischen Bindungen erfolgte die Membran-Vorhybridisierung (68°C, 60 min) in dem Vorhybridisierungspuffer (7% SDS, 10% PEG, 1.5 X SSPE, 0.1 mg / ml Herringsperma-DNA). Anschließend erfolgte die Membran-Hybridisierung über Nacht bei 68°C. Am folgenden Tag wurde die Membran mit dem auf 68°C vorgewärmten Waschpuffer (2X SSC, 0,1% SDS) drei Mal gewaschen und anschließend in eine dünne Plastikfolie eingewickelt und in der Phosphorimager-Kassette (Fuji Films, Japan) fixiert. Die Phosphorimager-Platte (Fuji Films, Japan) wurde auf die Membran gelegt und über Nacht abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phosphorimager-Platte wurde mit dem Gerät Phosphoimage Analyzer (FLA-3000 Serie, Fuji Films) abgelesen.

4.2.5 Zellbiologische Methoden

4.2.5.1 ES-Zellkultur und Blastocysteninjektion

Die ES-Zellkultur und die Blastozysteninjektion wurden von Frau Katrin Schorr (transgene Mausgenerierung, Core Unit, UKJ) durchgeführt.

4.2.5.2 Präparation und Kultivierung von primären kortikalen Neuronen und die Bestimmung der Neuronenzahl

Für die Gewinnung und anschließende Kultivierung primärer kortikaler Neurone wurden Gehirne von P1 Mäusen verwendet. Die Neuronenkultivierung erfolgte auf den mit Poly-L-

Lysin (PLL) beschichteten Deckgläschen unter sterilen Bedingungen. Das Protokoll beinhaltet die Gehirnentnahme, enzymatische Gewebeverdaу, mechanische Zelldissoziation und Entfernung von unnötigem Gewebehintergrund bevor der endgültigen Zellkultivierung.

Die Gehirnentnahme erfolgte nach der Dekapitation der P1 Mäuse mit einer kleinen Schere. Zur Schädelfixierung wurde mit einer gebogenen Pinzette in der Höhe der Augen eingestochen und mit der Schere über die hintere Schädelöffnung (*Foramen magnum*) entlang der mittleren Schädelnaht (*Sutura sagittalis*) der knöcherne Schädel eröffnet. Dabei wurde von hinten in Richtung Augen geschnitten. Die beiden großen Schädeldeckknochen (*Ossa parietale*) wurden mit einer feinen Pinzette zur Seite geklappt, mit der Pinzette oder einem kleinen Löffel das Gehirn herausgeholt, in eine Petrischale (6 cm im Durchmesser) überführt und auf Eis gelagert, bis alle Gehirne entnommen wurden. Unter Mikroskop wurde der Hippocampus entfernt und das restliche Gehirn von den Hirnhäuten befreit und in eine Petrischale (3,5 cm im Durchmesser) gelagert auf Eis überführt. Anschließend wurden die Gehirnreste mit einer gecoateten Pasteurpipette in ein Falcon (15 ml) gefüllt mit 5 ml HBSS überführt und unter der Sterilbank 3 Mal mit vorgekühltem HBSS gewaschen.

Die enzymatische Aktivierung vom Gemisch aus Trypsin, HEPES und Pen/Strep erfolgte durch Inkubation bei 37°C. Gleichzeitig wurde DNase auf Eis aufgetaut und 50 µl davon in das aktivierte Enzymgemisch dazugegeben. Nach dem letzten Waschschrift wurde das HBSS entfernt und das gesamte Enzymgemisch zugegeben. Die enzymatische Verdaу erfolgte im Wasserbad bei 37°C (25 min). Dabei wurden die Proben alle 5 min geschüttelt, um das sich immer wieder absetzende Gewebe vollständig zu verdauen. Das Enzymgemisch wurde entfernt und das verdaute Gewebe 3 Mal mit HBSS (5 ml) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 1,5 ml HBSS auf dem Gewebe belassen und 20 µl DNase dazugegeben. Das mechanische Gewebekomogenisieren erfolgte 3 Mal mit immer enger gecoateten Pasteurpipetten.

Die entstandenen Zellysate wurden nach Zugabe von 5 ml HBSS pelletiert (5 min, 160 g). Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 1 ml Plattierungsmedium gelöst.

Anschließend erfolgte die Zellzählung in der Neubauer-Kammer. Dabei wurden die in 16 Kleinquadraten gezählten Zellen mit 10000 multipliziert, die Zellzahl entsprach der Zellmenge pro Milliliter. Im Anschluß wurden die Zellen in die Schale mit Plattierungsmedium vorsichtig auf die mit PLL beschichteten Deckgläschen ausgesät und in den Brutschrank (CO₂ 5 %, 37°C) gestellt. Nach 30 min wurden die Deckgläschen in die Schalen mit dem Neuronenmedium (L-Glutamin, B27, Pen/Strept) überführt und für bestimmte Zeit im Brutschrank (CO₂ 5 %, 37°C) kultiviert.

4.2.5.3 Fixierung von primären kortikalen Neuronen in der Kultur

Die Fixierung primär Neuronenkultur erfolgte bei Raumtemperatur. Die Deckgläschen mit den darauf kultivierten Zellen wurden in eine neue Petrischale überführt und mit 1 ml PBS -/- einmal gewaschen. Danach wurden die Zellen mit frisch aufgetautem, vorgewärmtem PFA (4 %, 1 ml) bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS -/- dreimal gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Deckgläschen in eine neue 12-er Schale überführt und erst dann das dritte PBS-Volumen darauf gegeben.

Die Zellen wurden entweder im PBS bei 4°C gelagert oder gleich für die Immunfluoreszenz-(IF-)Färbungen verwendet.

4.2.5.4 Präparation und Kultivierung von primären Fibroblasten

Maus-adulte-Fibroblasten (MAFs) von zwei Monate alten Mäusen wurden nach dem Protokoll von Seluanov et al präpariert (Seluanov et al. 2010). Die Zellen wurden 10 Tage lang kultiviert, gesplittet und in 8 Kammer-Objektträgern für weitere 2 Tage kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und für die anschließenden Transfektionen bzw. IF-Färbungen verwendet.

4.2.6 Immunhistologische Methoden

4.2.6.1 Immunfluoreszenz-Färbung von primären kortikalen Neuronen

Die IF-Färbung erfolgte an den fixierten primären Neuronenkulturen. Die Fixationslösung wurde entfernt, die Zellmembran mit 500 µl Triton-X100 (0,25 % in PBS) permeabilisiert (15 min) und anschließend dreimal mit PBS -/- (0,5 ml) gewaschen. Vor der Behandlung der Zellen mit dem Primärantikörper wurden die Zellen mit 0,5 ml Blocklösung (5 % Ziegenserum in Triton-PBS 0,25 %) bei Raumtemperatur blockiert (40 min). Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper entweder bei Raumtemperatur 60 min lang oder bei 4°C dunkel gelagert in einer Feuchtkammer (Petrischale mit feuchtem Tuch) über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur 60 min lang inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS (3x, 0,5 ml, 5 min) gewaschen und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Nach 5 minütiger Inkubation mit DAPI wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen, die Deckgläschen auf die Objektträger gelegt und für mindestens 4 Stunden mit Alufolie abgedeckt bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

Die Neurone wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 *imaging* (Carl Zeiss, Deutschland) visualisiert und der integrierten Kamera AxioCam HRc (Carl Zeiss,

Deutschland) fotografiert und mit der Software *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD) analysiert. Statistische Evaluation erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* 5 (GraphPad, San Diego, CA).

4.2.6.2 Transfektion und Fluoreszenzfärbung von primären Fibroblasten

Für die Transfektion der Zellen mit dem LC3-RFP Konstrukt (freundlicherweise von C. Kaether zur Verfügung gestellt) wurde das Lipofectamin (Invitrogen, jetzt Life Technologies, Carlsbad, Kanada) benutzt.

Für die Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (4 %) fixiert, mit 0,1 % Triton X-100/PBS permeabilisiert (15 min) und anschließend in einem Blockpuffer aus Ziegenerum für 30 min inkubiert. Die Antikörper gegen EEA1, LAMP1 und SNX1 wurden für die Darstellung von Endosomen, Lysosomen und tubulären Endosomenausläufern benutzt, jeweils.

Die Bilder wurden mit einem konfokalen Leser-Scanning-Mikroskop (LSM710 Meta; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

4.2.7 Histologie: Mausperfusion, Gewebefixation und Herstellung von Rückenmarksschnitten

Die histologische Untersuchung erfolgte an 110 Wochen alten Mäusen. Die Tiere wurden mit Isofluran eingeschláfert, im Bereich von Brustkorb aufgeschnitten und das Herz freipräpariert. Linke Herzkammer wurde im Bereich der Herzspitze aufgeschnitten und die Kanüle (Fine Science Tools) bis in die Aorta hineingeschoben. Die entstandene Öffnung in der Herzkammer wurde mit einer Klemme verschlossen und die Spüllösung (PBS) durch die Kanüle in den Kreislaufsystem hineingelassen.

Nach einer Minute wurde das Gefäß mit der Fixationslösung (4 % PFA + 1 % Glutaraldehyd) an die Kanüle angeschlossen und die Fixationslösung mit der Fließgeschwindigkeit 50 ml/min in die Mäuse hineingepumpt. Nach ca. 10 min wurden die Mäuse vollständig fixiert. Das Rückenmark wurde als ganzes herauspräpariert und über Nacht in der Fixationslösung bei 4°C nachfixiert.

Am nächsten Tag wurde aus dem Lendenwirbelbereich ein Stück vom Rückenmark (ca. 0,5 cm) herausgeschnitten und in einer 12-er Platte (BD Bioscience, USA) in die abgekühlte noch flüssige Agarose (1 %) aufrecht eingebettet. Das Stück Rückenmark samt Agarose wurde im Vibratombekken auf die Vibratomschneideplatte mit einem Sekundenkleber (Henkel, Deutschland) festgeklebt und die Schnitte mit einer Dicke von 150 µm am Vibratom (Leica

Biosystems, Deutschland) gemacht. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel in die Schalen mit 1x PBS überführt und durch sanftes Schütteln mit PBS gewaschen (3 x 10 min). Danach wurden die Schnitte in die Schalen mit Cacodylatpuffer (0,1 M; pH 7,4) überführt und wieder durch sanftes Schütteln mit Cacodylatpuffer gewaschen (3 x 10 min). Die Schnitte wurden im Cacodylatpuffer über Nacht bei 4°C gelagert. Die Gewebevorbehandlung für die Semidünnschnitte erfolgte nach dem in Beetz et al (2013) beschriebenen Protokoll. Die Semidünnschnitte und die Bildaufnahmen wurden von Herrn Dr. Sandor Nitzsche (Institut für Pathologie, UKJ) bearbeitet und durchgeführt.

4.2.8 Tierexperimente

4.2.8.1 Messung des Körpergewichtes

Für die Messung des Körpergewichtes wurde die Laborwaage LP3200D (Sartorius, Deutschland) verwendet. Ein Glasgefäß mit dem Durchmesser von ca. 20 cm wurde auf die Waage gestellt und die Waage wurde austariert. Danach wurden die Mäuse in einer definierten Reihenfolge in das Gefäß gesetzt, das Gewicht abgelesen und notiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *GraphPad* (2way-ANOVA, Bonferroni t-test).

4.2.8.2 Messung des Fußbasenwinkels

Zwei Tage vor dem eigentlichen Filmen der Mäuse zum Zwecke statistischer Auswertung des Fußbasenwinkels wurden die Tiere trainiert. Dabei wurden die Mäuse dreimal am Tag auf einen ca. 80 cm langen, 4 cm breiten Holzbalken gesetzt und zu dem anderen Balkenende in Käfigrichtung laufengelassen.

Bezogen auf die erfolgreiche Bestimmung des Krankheitsbeginns und der Progression motorischer Beeinträchtigung in dem Projekt verwandten SPG31 Mausmodell (Beetz et al. 2013) wurden Untersuchungen im Alter von 18 Wochen gestartet. In einem sogenannten „Beam-Walking-Test“ wurde die Bestimmung des Fußbasenwinkels durchgeführt. Nach dem zweitägigen Training wurden die Tiere auf den Holzbalken platziert und von hinten gefilmt. Der Winkel, den Hinterpfoten mit der Holzstab-Laufläche bildeten, wurde gemessen (Irintchev et al. 2005).

4.2.8.3 Rotarod-Analyse

Für die Messung der motorischen Beeinträchtigung wurde beschleunigte Variante (4-40 rpm in 5 min) der Rotarod-Analyse gewählt. Die Messung erfolgte mit dem Rotarod-Gerät der Firma FBI Science GmbH (Essen, Deutschland). Die Tiere wurden auf eine sich rotierende

Achse gesetzt und die Achse-Verweildauer der Mäuse gemessen. Die zeitliche Obergrenze wurde auf 300 Sekunden gesetzt. Das Protokoll wurde der Veröffentlichung Khundadze et al (2013) entnommen. Zusammengefasst: vor der eigentlichen Messung wurden die Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen trainiert, je sechs Läufe pro Tag. Am dritten Tag erfolgte die eigentliche Datenerfassung.

4.2.9. Messung von Zellauswüchsen in primären kortikalen Neuronen

Geschlechtsreife heterozygote *Knockins* und *Knockouts* Männchen wurden mit C57BL/6J Wildtyp-Weibchen terminiert verpaart. Am ca. Tag 22 post coital wurden P1-Jungtiere geboren. Deren Schwanzspitzen wurden zur Isolierung genomischer DNA und anschließender Genotypisierung mittels PCR entnommen. Für die Präparation der kortikalen Neurone wurden je zwei Gehirne pro Genotyp genommen. Die Ausbeutungsrate einzelner Gehirne ertrug ca. 10^5 Zellen/ml Neuronenmedium. Mit einer Dichte von ca. 30000 Zellen/ml Neuronenmedium wurden die frisch präparierten Neurone ausgesät. Schon am ersten Tag nach der Präparation wurden kleine Zellauswüchse im Lichtmikroskop beobachtet. Alle 48 Stunden wurde das alte Neuronenmedium zu 75 % durch das frisch angesetzte Neuronenmedium ersetzt. Bei jedem Mediumwechsel wurden die Neurone an ihre Vitalität im Lichtmikroskop untersucht. 48 (*Knockin*) und 96 (*Knockin*, *Knockout*) Stunden nach der Kultivierung wurden Neurone mit 4 % PFA fixiert und mit einem axonspezifischen primären Antikörper inkubiert. Zur Darstellung des primären Antikörpers wurde ein mit Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper verwendet. Die Neuronenbilder wurden an einem mit Fotokamera ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) aufgenommen. 60-100 Zellen je Genotyp wurden mittels *ImageJ*-Software auf die Axonlänge untersucht. Die einzelnen Bilder wurden in die Software hochgeladen, die längsten Zellausläufer mittels Cintiq 12WX Tablett (Wacom Europe GmbH, Deutschland) gemessen und die Daten auf einen 100 μ m Maßstabbalken normiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *GraphPad 5*.

5. Ergebnisse

Es wurden zwei (*knockin* und *knockout*) potentielle Mausmodelle für die hereditäre spastische Paraplegie Typ SPG8 generiert. Das *knockin* Modell repräsentiert die humanpathogene Punktmutation p.N471D im Strumpellin Protein. Das *knockout* Allel repräsentiert eine „loss-of-function“ Mutation. Generierung und Etablierung der oben genannten Mauslinien werden im ersten Abschnitt des Ergebnisteils beschrieben. Der zweite Abschnitt beschreibt die Charakterisierung der Mauslinien.

5.1 Generierung von Mauslinien mit genetisch modifiziertem SPG8 Locus

Die Generierung von genetisch veränderten Mäusen setzt die Klonierung bzw. die Konstruktion des gewünschten Gene-Targeting-Vektors (GTV) voraus. Die dafür benötigte genomische Maus-DNA kann aus einer kommerziell erhältlichen Lambda-Bibliothek isoliert werden.

Nach erfolgreicher Klonierung und anschließender Sequenzierung der relevanten Schnittstellen wird der GTV in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) zur homologen Rekombination eingebracht. Zellklone, die heterozygot für das Target-Allel sind, weisen auf eine stattgefunden Rekombination homologer DNA-Regionen hin. Sie werden kultiviert und zur Mikroinjektion in die Maus-Blastozysten aufgearbeitet.

Nach Injektion der Zellen erfolgt der Blastozystentransfer in pseudoschwangere Weibchen. Als Ergebnis des erfolgreichen Blastozystentransfers werden chimäre Mäuse geboren, die zur weiteren Generierung der gewünschten Mauslinien eingesetzt werden.

5.1.1 Klonierung des Gene-Targeting-Vektors

Mit Hilfe von Vorarbeiten von M. Khundadze (Institut für Humangenetik, UKJ) wurde über das Screenen einer murinen Phagenbibliothek zuerst ein genomisches DNA-Fragment isoliert, welches auf 11,8 kb die Introns 9 bis 19 des *KIAA0196* Maushomologes enthält, und vorübergehend in einem pBS-Vektor kloniert. Die nachfolgende Sequenzierung des genomischen DNA-Fragmentes bestätigte den erwünschten Abschnitt muriner DNA von 7,7 kb, nämlich den DNA-Bereich zwischen Intron 9 und Intron 15, flankiert von *SpeI*-Schnittstellen.

Alle Arbeiten, die nach diesem Schritt erfolgten, wurden durch den Dissertationsverfasser realisiert.

Zum Klonieren des GTV für die *KIAA0196 knockin* und *knockout* Maus wurde ein pKO-DTA Vektor als Basisvektor benutzt. Nun wurde der Basisvektor mit Enzymen *HindIII* und *BglII* verdaut, das entsprechende DNA-Fragment mittels Agarosegel-Elektrophorese aus dem Basisvektor entfernt, der Basisvektor aus dem Agarosegel aufgereinigt und mit einem Oligonukleotid *HindIII-SpeI-SpeI-BglII* ligiert. Darauffolgend wurde der Basisvektor enzymatisch mit *SpeI* verdaut und mit dem 7,7 kb großem *SpeI*-Fragment ligiert. Im nächsten Schritt wurde eine PCR-basierte Mutagenese, notwendig für die Herstellung der *knockin* Linie, durchgeführt und das Mutageneseprodukt inklusive *AscI*-Linker in den Basisvektor über *NruI-HindIII* eingesetzt. Nachfolgende Sequenzierung des Mutageneseproduktes am Kapillarsequenzier zeigte den gewünschten Basenaustausch, der zur A-G Austauschmutation p.N471D führt.

Danach erfolgten die weiteren notwendigen genetischen Manipulationen. Im Intron 11 Bereich wurde als positiver Selektionsmarker eine *Neomycin*-Kassette flankiert von *frt*-Sequenzen und einer *loxP*-Sequenz kloniert. Durch das Klonieren der *Neomycin*-Kassette wurde eine zusätzliche *XbaI* Schnittstelle in den GTV eingebracht, um das Southernblot basierte Screening für rekombinierte Klone zu ermöglichen. Im Intron 12 Bereich wurde über eine *NspI* Schnittstelle eine weitere *loxP*-Sequenz eingesetzt (Abb. 6).

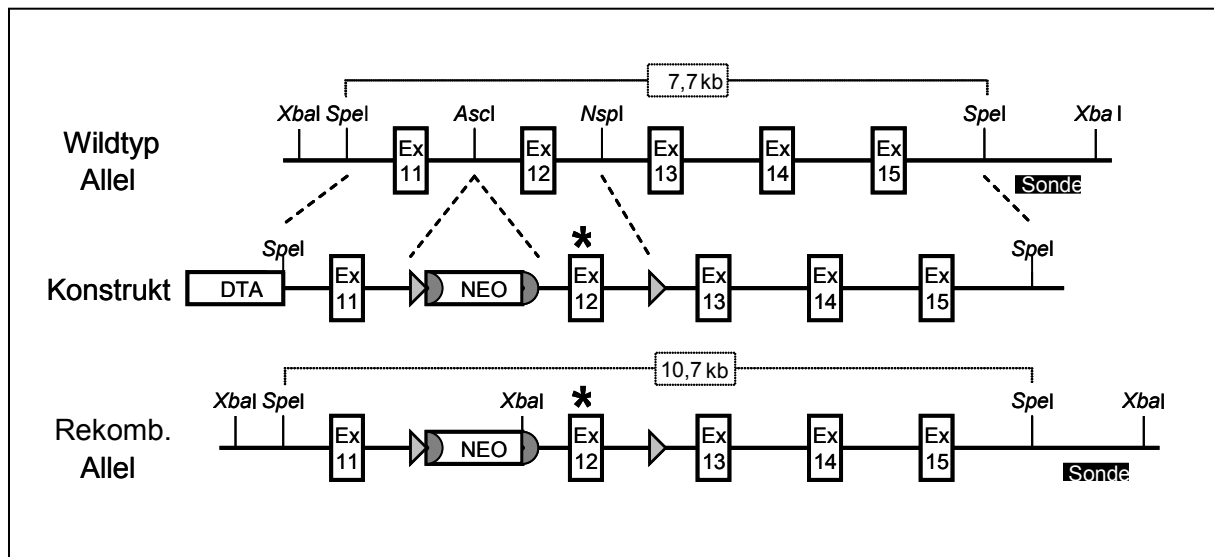


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Gen-Targeting-Vektors. Das Wildtyp-Allel zeigt ein Fragment genomischer Maus-DNA und die für die Klonierung notwendigen Schnittstellen. „Sonde“ Lage der Sonde für den Southernblot an *XbaI* verdauter genomischer DNA aus ES-Zellen (siehe Abbildung 9). Das fertige Konstrukt liegt im pKO-DTA Vektor. Stern: Entsprechung einer humanpathogenen Punktmutation (p.N471D). Hellgraue Dreiecke: *loxP*-Sequenzen. Dunkelgraue Halbkreise: *frt*-Sequenzen. NEO=Neomycin-Kassette als positiver Selektionsmarker. DTA=DTA-Gen als negativer Selektionsmarker. Rekomb. Allel=das rekombinante Allel nach erfolgreicher homologer Rekombination (siehe Abbildung 7).

Das fertige Konstrukt von 10,7 kb Länge lag mit Rekombination von Klonierungsstellen im pKO-DTA Vektor vor und besaß Rekombinationsflanken von 2,6 kb und 4,5 kb. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft. Das fertige Konstrukt wurde über die *NotI* Schnittstelle linearisiert und für die ES-Zellkultur aufgereinigt.

5.1.2 Nachweis homologer Rekombination und Generierung chimärer Mäuse

Zur Generierung genetisch modifizierter Mäuse wurde das linearisierte Konstrukt in die mit positivem Selektionsmedium (beinhaltet *Neomycin*) behandelten ES-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. 400 *Neomycin*-resistente Klone wurden vereinzelt und expandiert und von Replica-Platten dieser Klone DNA isoliert. Die ES-Zellen DNA wurde mit *XbaI* verdaut und mit Southernblot analysiert. Die Kandidatenklone mussten ein Wildtyp-Allel von 11,8 kb und ein rekombiniertes Target-Allel von 7,4 kb aufweisen. Das darauffolgende Southernblot basierte Screen mit einer ³²P markierten 3' bindenden Sonde führte schon bei der Analyse der ersten Platte zur Identifikation von sieben rekombinierten ES-Zellklonen, die heterozygot für das Target-Allel waren (Abb. 7).

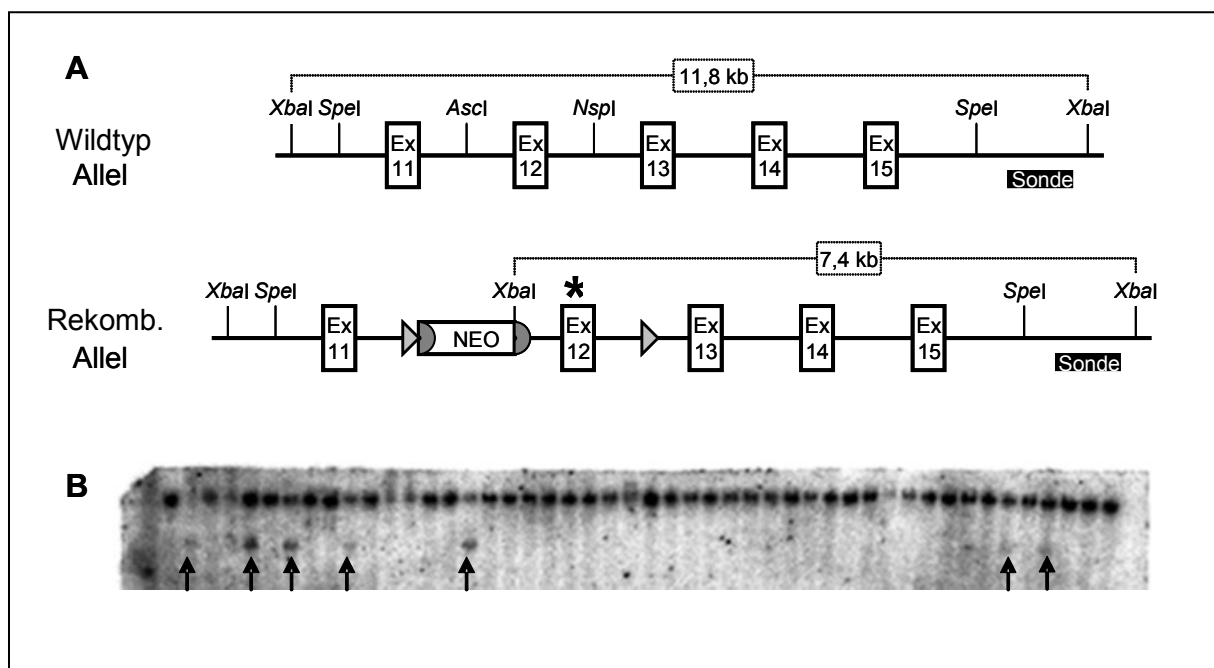


Abbildung 7: Generierung muriner *knockin* und *knockout* Linien des *KIAA0196* Homologs. (A) Das Wildtyp- und rekombinante Allel entsprechend der Klonierungsstrategie (siehe Abbildung 8). „Sonde“ Lage der Sonde für den Southern-Blot an *XbaI* verdauter genomischer DNA aus ES-Zellen. (B) Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone (Pfeile) mittels Southernblot (obere Reihe=Wildtyp-Allel (11,8 kb), untere Reihe=rekombinantes Allel (7,4 kb)). Rekomb. Allel=das rekombinante Allel nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Einer der sieben rekombinierten ES-Zellklone wurde im Anschluss in murine Blastozysten mit C57BL/6J Hintergrund injiziert. Der Blastozystentransfer erfolgte in die Gebärmutter einer C57BL/6J Ammenmaus, was in der Geburt von fünf chimären Männchen-Mäusen

resultierte. Die Chimären wurden dann auf das Vorhandensein des Target-Allels untersucht. Dies wurde mittels Target-Allel spezifischer PCR durchgeführt. Der gleichzeitige Nachweis von Wildtyp-Allel und rekombiniertem Target-Allel in einem einzelnen drei-Primer PCR-Ansatz (Intron11_F, Neo_F, Intron11_R) war nicht erfolgreich. Deshalb erfolgte Allelenunterscheidung durch zwei separate „zwei-Primer PCR-Ansätze“ (a. Intron11_F vs. Intron11_R für das Wildtyp-Allel, b. Neo_F vs. Intron11_R für das rekombinierte Target-Allel) (Abb. 8).

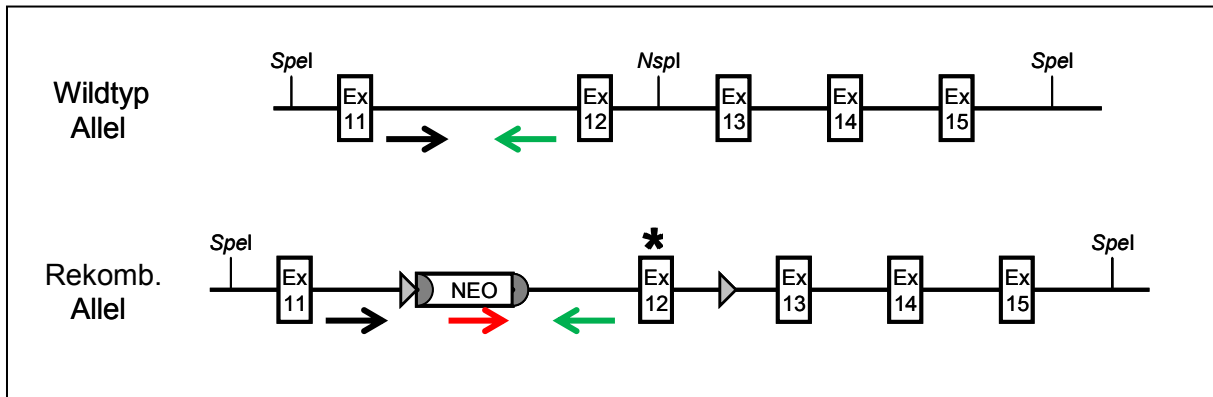


Abbildung 8: Genotypisierungsstrategie für den Nachweis des Target-Allels in Chimären. Pfeile stellen die Genotypisierungsprimer dar und geben die Primerposition in der genomischen DNA an. Schwarzer Pfeil=Intron 11 Vorwärts-(Intron11_F)-Primer, grüner Pfeil=Intron 11 Rückwärts-(Intron11_R)-Primer, roter Pfeil=Neomycin-Kassette Vorwärts-(Neo_F)-Primer. Rekomb. Allel=das rekombinante Allel nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Anhand der vorliegenden Sequenzen wurde die Größe der Amplifikate berechnet. Die verwendeten Primerpaare amplifizieren eine 158 bp große Wildtypbande und eine 224 bp große Bande für das rekombinierte Target-Allel. Als Negativ-Kontrolle für das rekombinierte Target-Allel wurde genomische DNA einer weiteren HSP-Mauslinie benutzt (Abb. 9).

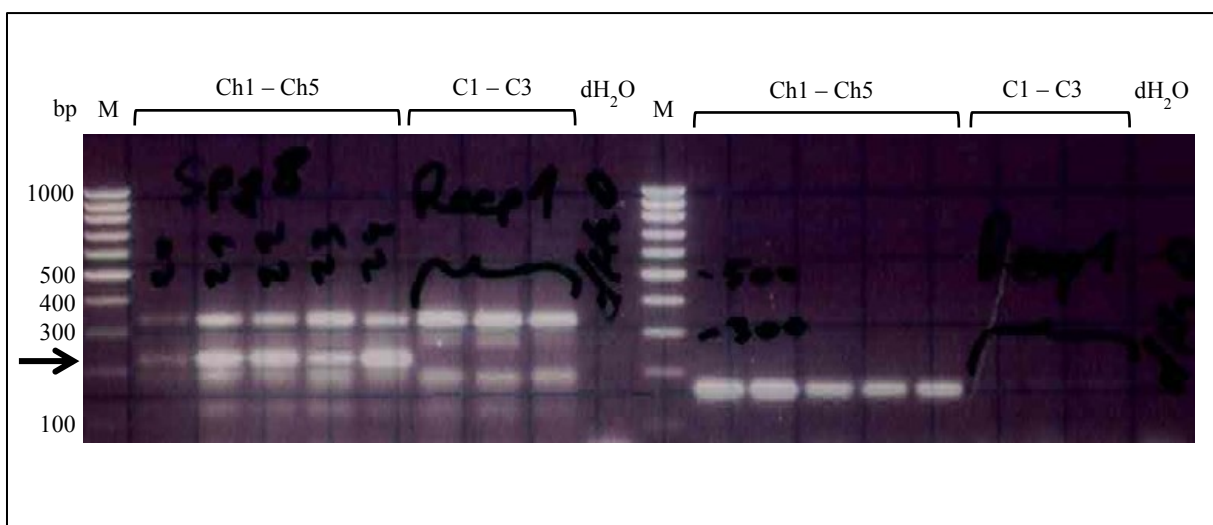


Abbildung 9: Nachweis des Wildtyp- und des rekombinierten Allels in Chimären (Ch1-Ch5). Die ca. 330 bp große Bande in Chimären und Kontrollmäusen (C1-C3) ist als unspezifisch zu bewerten. Eine schwache Wildtyp-Bande in Kontrollmäusen ist nachweisbar, bedingt durch den unterschiedlichen

Maushintergrund (C57BL/6J vs. 129SvJ). bp: Basenpaare. M: Größenmarker. dH₂O: negative Wasserkontrolle. Schwarzer Pfeil=224 bp große Bande spezifisch für das rekombinierte Allel.

Zur Absicherung der PCR-Ergebnisse erfolgte eine zusätzliche Sequenzierung der relevanten genomischen DNA-Abschnitte (*loxP*-Sequenzen, 5' Bereich der *Neomycin*-Kassette, Exon 12 auf das Vorhandensein der eingefügten Punktmutation p.N471D) in Chimären. Alle Sequenzen ergaben korrekte Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

5.1.3 Nachweis der Keimbahntransmission

Zum Nachweis der Keimbahntransmission wurde eine von fünf vorhandenen männlichen *KIAA0196*-Chimären mit weiblichen C57BL/6J Wildtyp-Mäusen verpaart und die Nachkommen mit Hilfe der Target-Allel spezifischen PCR-Strategie genotypisiert (Abb. 8). Das Target-Allel wurde in den Nachkommen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Infolgedessen wurde die Untersuchung der restlichen vier Ursprungs-Chimären in Bezug auf die Keimbahntransmission gestoppt.

5.1.4 Etablierung der Mauslinien

Zur Erzeugung der *KIAA0196 knockin* und *knockout* Mauslinien wurde zunächst eine Kohorte bestehend aus chimären heterozygoten Tieren aufgebaut. Über zwei weitere Verpaarungen mit einer *Flp*-Rekombinase exprimierenden und einer *Cre*-Rekombinase exprimierenden Mauslinie wurden die endgültigen *KIAA0196 knockin* und *knockout* Linien generiert.

5.1.4.1 Etablierung der *knockin* Linie

Zur Erzeugung der SPG8 *knockin* Mauslinie wird eine *Flp-Deleter* Mauslinie benötigt (Abb. 12). Diese Mauslinie wurde freundlicherweise von der Core Unit des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt.

Die Rekombinase *Flp* (*Flippase*) erkennt ihre 34 bp lange Erkennungssequenz FRT (eng. *flippase recombinase target*) und katalysiert eine Rekombination eines von zwei solchen Sequenzen flankierten DNA-Abschnittes (Dymecki 1996). In Abhängigkeit von der Orientierung dieser Erkennungssequenzen findet entweder eine Deletion oder eine Inversion des betroffenen DNA-Abschnittes statt. Dieser Mechanismus wird im Falle von *KIAA0196* Chimären zum Ausschneiden der *Neomycin*-Kassette benutzt (Abb. 10).

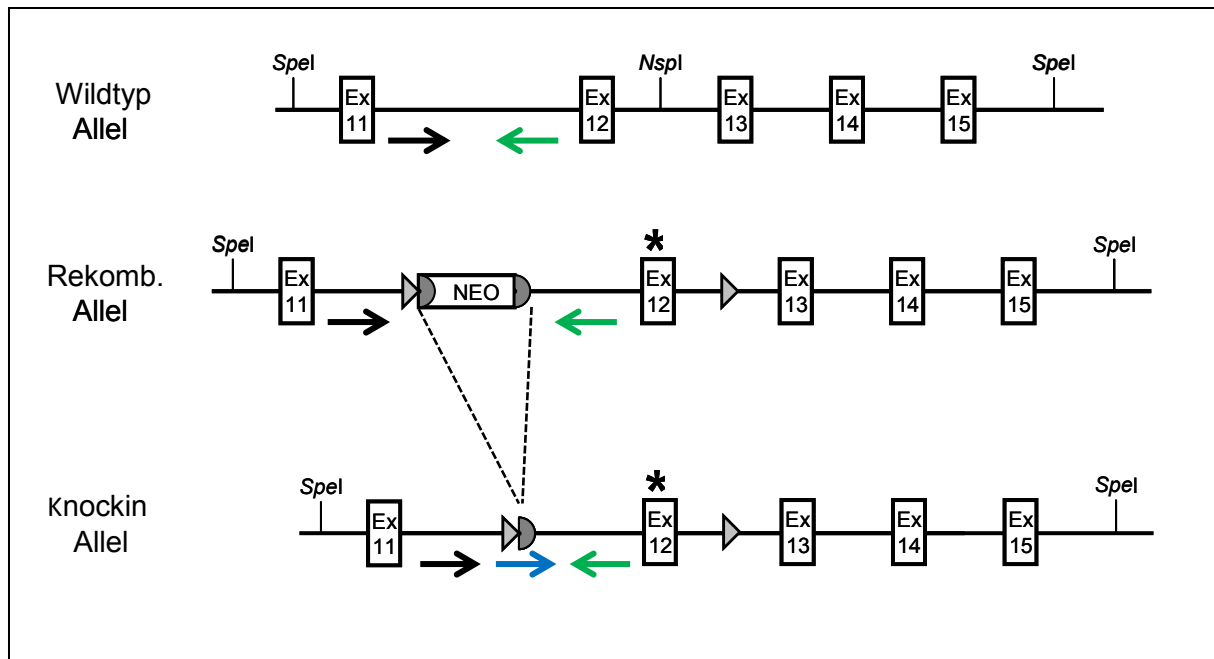


Abbildung 10: Genotypisierungsstrategie für den Nachweis der *knockin* Linie. Pfeile stellen die Genotypisierungsprimer dar und geben die Primerposition in der genomischen DNA an. Schwarzer Pfeil=Intron 11 Vorwärts-(Intron11_F-)Primer, grüner Pfeil=Intron 11 Rückwärts-(Intron11_R-)Primer. Rekomb. Allel=das rekombinante Allel nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Durch das Kreuzen der KIAA0196 Chimären mit der *Flp-Deleter* Maus wurden Nachkommen erzeugt, die in ihrem Genom sowohl das rekombinante Target-Allel als auch das *Flp*-Transgen tragen. Zum Auskreuzen des *Flp*-Transgens und Etablierung heterozygoter SPG8 *knockin* Mauslinie wurden diese Nachkommen mit C57BL/6J Wildtyp-Mäusen zurückgekreuzt.

5.1.4.2 Genotypisierungsergebnisse der *knockin* Linie

Im Alter von 2 Wochen wurden die Schwanzspitzenbiopsien der o.g. Nachkommen entnommen und die genomische DNA isoliert. In einem zwei-Primer PCR-Ansatz (Intron11_F vs. Intron11_R) wurde die *knockin* Linie nachgewiesen. Die Größe der Amplifikate wurde anhand der vorhandenen Sequenzen berechnet (Wildtyp-Allel: 158 bp, *Knockin*-Allel: 281bp) (Abb. 11).

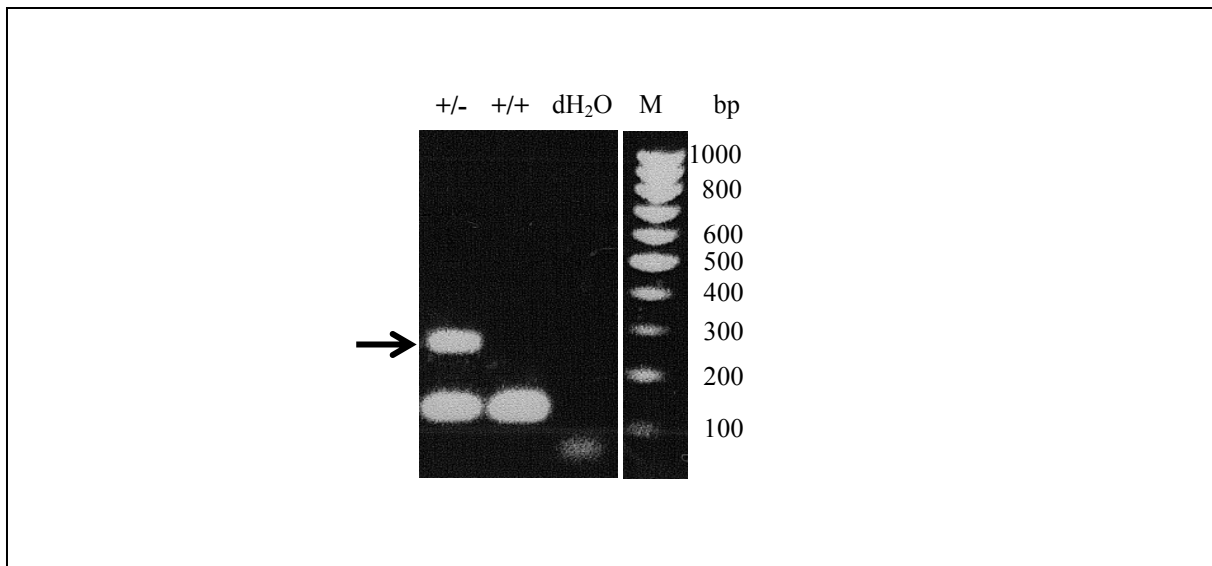


Abbildung 11: Nachweis der heterozygoten *knockin* Linie. +/-: heterozygoten *Knockin*-Allel. +/+: Wildtyp-Allel. bp: Basenpaare. M: Größenstandard. dH₂O: negative Wasserkontrolle. Schwarzer Pfeil=281 bp große Bande spezifisch für das *Knockin* Allel.

Zur Bestätigung der humanpathogenen Punktmutation p.N471D im Exon 12 erfolgte die Sequenzierung genomischer DNA einer heterozygoten SPG8 *knockin* Maus (Daten nicht gezeigt).

5.1.4.3 Etablierung der *knockout* Linie

Zur Etablierung der *knockout* Linie für das Maushomolog *KIAA0196* wurde eine *Cre-Deleter* Mauslinie benötigt (Abb. 12). Auch diese Mauslinie wurde freundlicherweise von der Core Unit des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt. Die verwendeten *Cre-Deleter* Mäuse zeigten eine ubiquitäre *Cre*-Rekombinase Expression, was einen kompletten *Knockout* in sämtlichen Geweben zur Folge hat.

Ähnlich wie das *Flp-FRT*-System erkennt die Rekombinase *Cre* (eng. *cyclization recombination*) die 34 bp lange *loxP* Sequenz. Demzufolge wird ein von zwei solchen Sequenzen flankierter DNA-Abschnitt gefloxt („floxed“, engl. flanked by *loxP*). Das bedeutet, auch im *Cre-loxP*-System kann in Abhängigkeit von der Orientierung und Lage dieser Erkennungssequenzen entweder eine Deletion oder eine Inversion des zwischen den zwei *loxP*-Sequenzen liegenden DNA-Abschnittes stattfinden (Abb. 12).

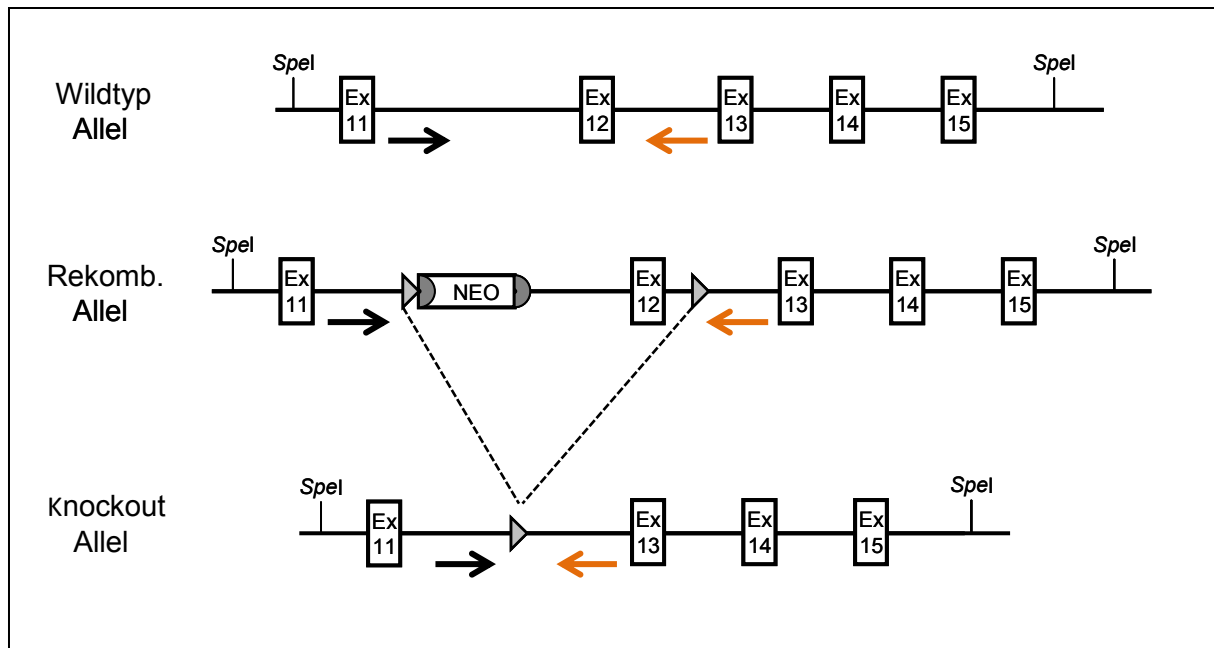


Abbildung 12: Genotypisierungsstrategie für den Nachweis der *knockout* Linie. Pfeile stellen die Genotypisierungsprimer dar und geben die Primerposition in der genomischen DNA an. Schwarzer Pfeil=Intron 11 Vorwärts-(Intron11_F-)Primer, oranger Pfeil=Intron 12 Rückwärts-(Intron12_R-)Primer. Rekomb. Allel=das rekombinante Allel nach erfolgreicher homologer Rekombination.

Eine erfolgreiche homologe Rekombination in ES-Zellen, die Generierung chimärer Mäuse, Rekombination in chimären Keimzellen und letztendlich die Kreuzung der Chimären mit *Cre-Deleter* Mäusen waren die Voraussetzungen für die Erzeugung der *knockout* Linie. Die Nachkommen, die gleichzeitig das rekombinante Allel und ein Cre-Rekombinase Allel trugen, wurden mit C57BL/6J Wildtyp-Mäusen verpaart. Somit wurden heterozygote *Knockouts* generiert.

5.1.4.4 Genotypisierungsergebnisse der *knockout* Linie

Aus den Schwanzspitzenbiopsien wurde die genomische DNA der Nachkommen isoliert und die Tiere mittels PCR genotypisiert. In einem zwei-Primer PCR-Ansatz (Intron11_F vs. Intron12_R) wurde das *knockout* Allel nachgewiesen. Die Größe der Amplifikate wurde anhand der vorhandenen Sequenzen berechnet. Die verwendeten Primerpaare amplifizieren eine 741 bp große Bande im Wildtyp-Allel und eine 202 bp große Bande im *Knockout*-Allel (Abb. 13).

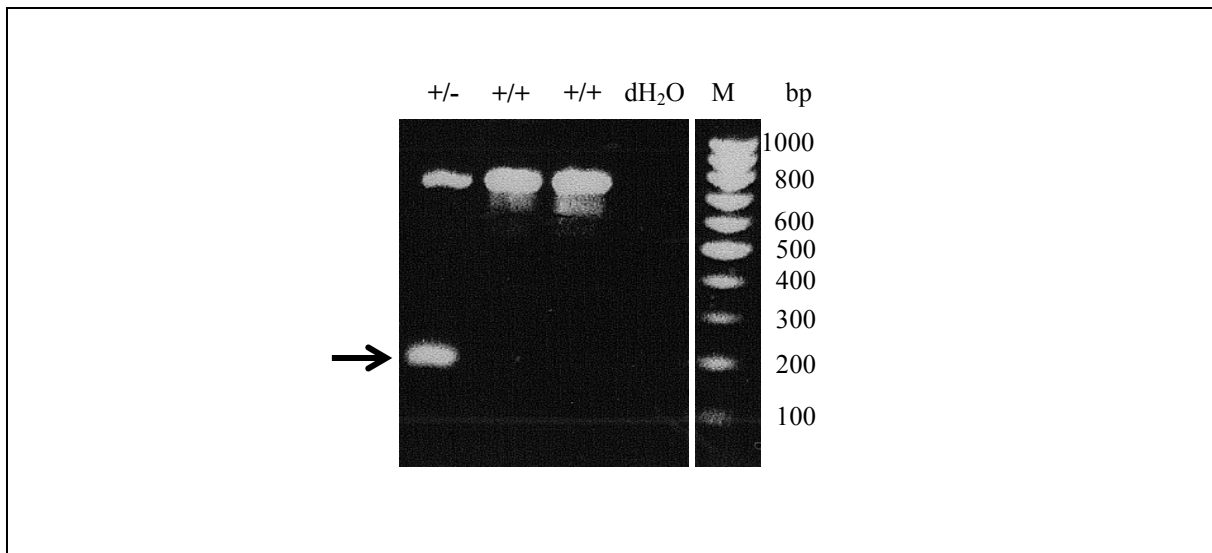


Abbildung 13: Nachweis der heterozygoten *knockout* Linie. +/-: heterozygoten *Knockout*-Allel. +/+: Wildtyp-Allel. bp: Basenpaare. M: Größenstandard. dH₂O: negative Wasserkontrolle. Schwarzer Pfeil=202 bp große Bande spezifisch für das *Knockout* Allel.

Die mRNA aus dem Gehirngewebe einer heterozygoten *knockout* Maus wurde aufgereinigt und mittels *reverse Transkriptase* (RT)-PCR in cDNA umgeschrieben. Das PCR-Gemisch wurde auf das Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die aufgetrennte cDNA-Probe der heterozygoten *knockout* Maus zeigt eine Doppelbande: eine Bande normaler Größe (Wildtyp: 340 bp) und zusätzlich eine kleinere Bande (*Knockout*: 227 bp) (Abb. 14a). Die letztere wurde in den Wildtyp-Proben nicht nachgewiesen und repräsentiert das Transkript der mRNA, in der das Exon 13 direkt dem Exon 11 folgt. Dies wurde durch die Sequenzierungsanalyse bestätigt (Abb. 14b). Die Schwäche der *Knockout*-Bande ist am ehesten durch den “non-sense mediated decay” Mechanismus zu erklären, bedingt durch die Präsenz eines präterminalen Stop-Codons im verschobenen Leserahmen von Exon 13. Deshalb repräsentiert die Deletion von Exon 12 ein *Knockout*-Allel.

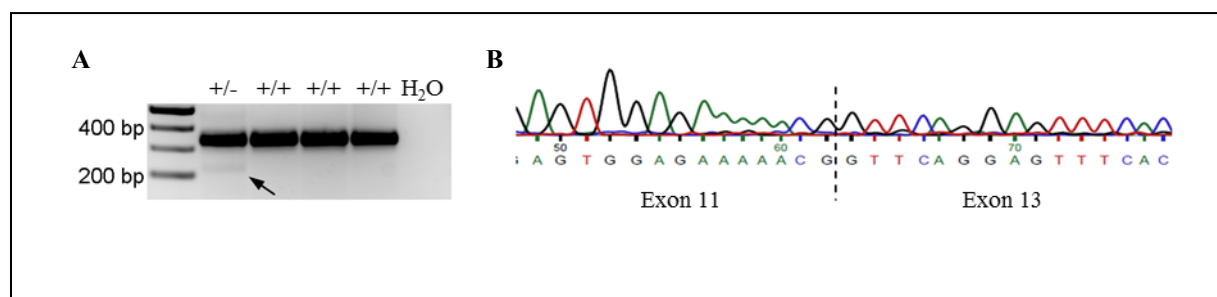


Abbildung 14: (A) *rt*-PCR mit Vorwärts- und Rückwärts-Primern, jeweils in Exon 11 und Exon 13. Das kleine PCR-Produkt (Pfeil) ist spezifisch für die *Cre*-Rekombinase bedingte Deletion eines DNA Abschnittes im Maushomolog *KIAA0196*. (B) Das Sequenzierungsergebnis des in (A) markierten PCR-Produkts.

5.2 Charakterisierung von Mauslinien mit genetisch modifiziertem SPG8-Locus

Die Konstruktion des GTVs erfolgte an genomischer DNA mit 129SvJ Hintergrund. Somit besaßen beide Linien heterozygoter F1-Tiere einen gemischten genetischen Hintergrund (129SvJ (50%), C57BL/6J (50%)). Um einen möglichst hochgradigen C57BL/6J Hintergrund in nachkommenden Generationen zu erreichen, wurden die Nachkommen heterozygoter F1-Tiere mehrmals mit C57BL/6J Wildtyp-Mäusen rückgekreuzt. Der Anteil von Wildtyp- und heterozygoten Tieren in den Generationen N2-N4 beider Mauslinien war im Einklang mit den Mendelschen Regeln (Ergebnisse nicht gezeigt). Die heterozygoten *knockin* und *knockout* Mauslinien zeigten keine Auffälligkeiten in Bezug auf Sterblichkeit der Nachkommen. Somit wurde für die anstehenden Charakterisierungsversuche mit der Kohortenbildung begonnen. Dies erfolgte mit Generation N5 (96,9% C57BL/6J-Hintergrund).

5.2.1 Charakterisierung der *knockin* Linie

5.2.1.1 Kreuzung und Lebensfähigkeit

Der heterozygote *Knockin* soll das menschliche Krankheitsmodell widerspiegeln. Eine postnatale Letalität bei Vorliegen von homozygotem *Knockin* konnte aufgrund des derzeit unklaren funktionellen Mechanismus der humanpathogenen Punktmutationen p.N471D im SPG8-Locus nicht ausgeschlossen werden. Um diese Fragestellung zu klären, wurde im Alter von 8 Wochen mit der Kreuzung heterozygoter *Knockins* begonnen. Insgesamt wurden 3 Zuchtkäfige mit je einem Männchen und zwei Weibchen angesetzt. Dies resultierte in der Geburt von 23 Jungtieren. Anhand der Amplifikatgröße und des Bandenmusters konnten alle drei Genotypen (*wt/wt*, *wt/ki*, *ki/ki*) nachgewiesen werden (Abb. 15).

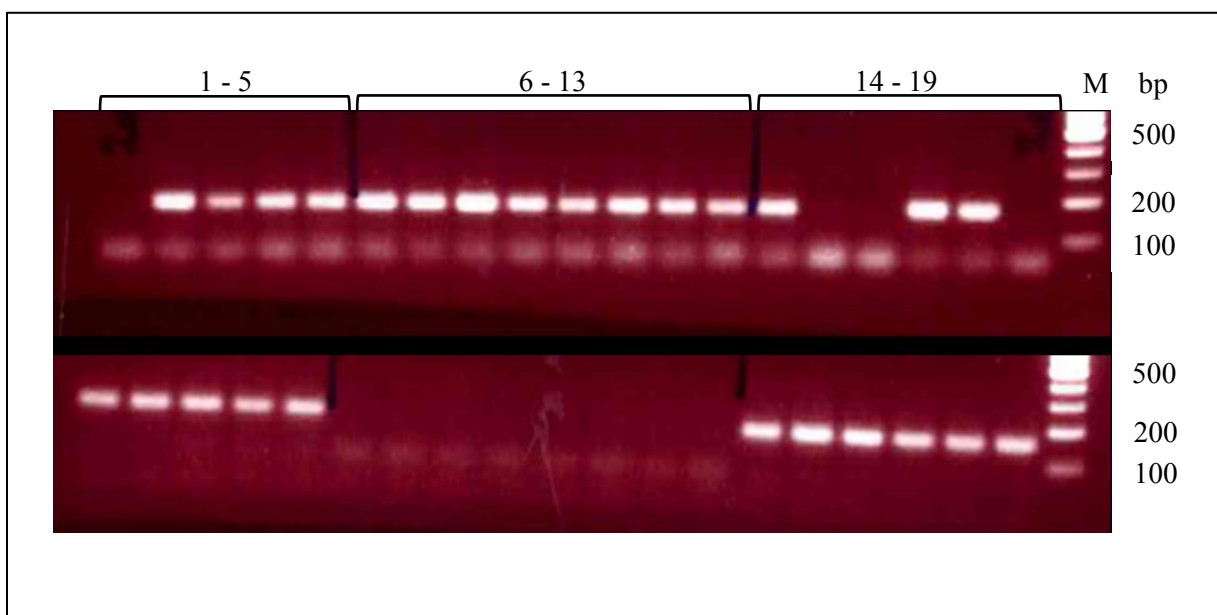


Abbildung 15: Ergebnisbeispiel einer Genotypisierung nach Verpaarung heterozygoter *Knockins* (*wt/ki* vs. *wt/ki*). Die obere Bildhälfte repräsentiert das Amplifikat aus dem *Knockin*-Allel, 224 bp

(Primer: Ki_Spez_F vs. Int_11_R). Die untere Bildhälfte stellt das Amplifikat aus dem Wildtyp-Allel dar, 158 bp (Primer: Intron11_F vs. Intron 11_R). Die Positionen 1, 15, 16 und 19 repräsentieren die Wildtyp-Mäuse (*wt/wt*), die Positionen 2 – 5, 14, 17 und 18 repräsentieren heterozygote *Knockins* (*wt/ki*) und die Positionen 6 – 13 repräsentieren homozygote *Knockins* (*ki/ki*). Bp: Basenpaare. M: Größenstandard (100 bp Marker).

Die Ergebnisse wurden auf der Transkript-Ebene reproduziert. Die Gesamt-RNA aus den Mausgehirnen wurde präpariert und die Qualität der gewonnen RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Alle RNA-Präparationen zeigten eindeutig 18S- und 28S-Banden ribosomaler RNA und waren kaum degradiert (Abb. 16). Somit konnten sie für die cDNA-Synthese mittels RT-PCR verwendet werden.

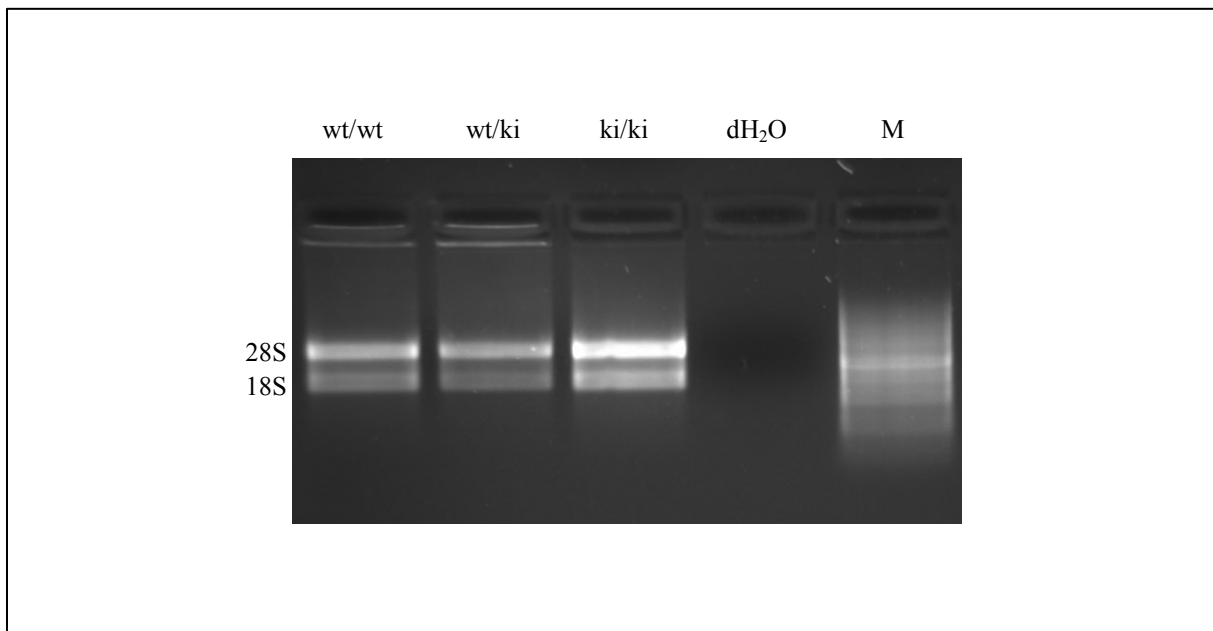


Abbildung 16: RNA-Präparation aus dem Gehirngewebe einer Wildtyp-Maus (*wt/wt*), eines heterozygoten *Knockins* (*wt/ki*) und eines homozygoten *Knockins* (*ki/ki*). dH₂O: negative Wasserkontrolle. M: Größenstandard (1 Kilobasenpaare-Marker). 18S- und 28S-Banden ribosomaler RNA.

Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurde die PCR durchgeführt und das PCR-Gemisch auf das Agarosegel aufgetragen. Nach der „DNA-Trennung“ zeigten die untersuchten Proben jeweils nur eine Bande. Einzelne Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Alle drei Genotypen wurden nachgewiesen. Somit wurde die genomische Modifikation A zu G (p.N471D) auch auf cDNA-Ebene bestätigt (Abb. 17).

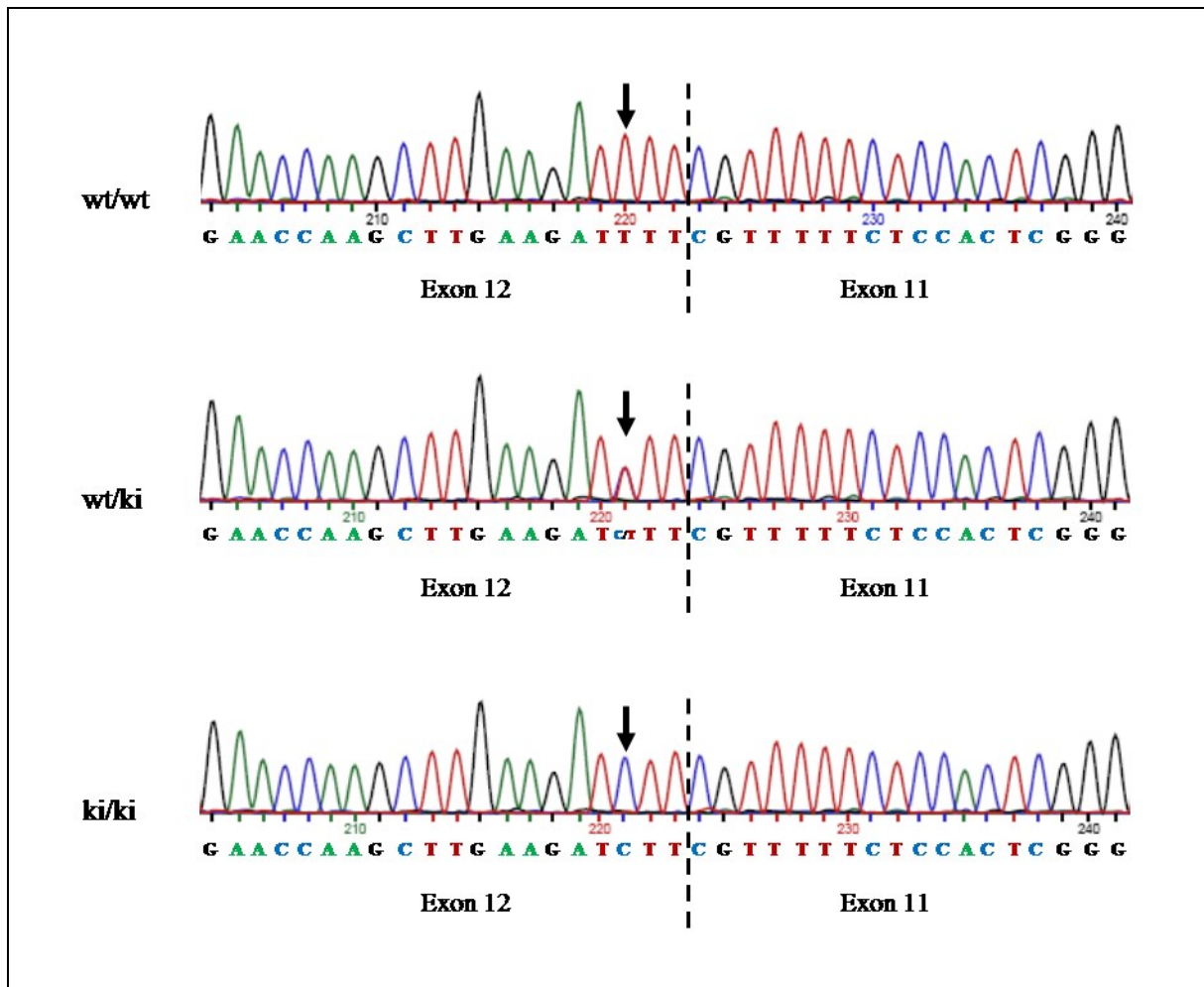


Abbildung 17: Sequenzierungsergebnisse von drei Mausgenotypen. Pfeile zeigen die Position von dem Basentausch C zu T in der cDNA. Gestrichelte Linie stellt die Exongrenzen von Exon 11 und Exon 12 dar. wt/wt=Wildtyp, wt/ki= heterozygoter *Knockin*, ki/ki=homozygoter *Knockin*.

5.2.1.2 Körpergewicht

Die Hereditäre Spastische Paraplegie Typ SPG8 ist eine Erkrankung des Bewegungsapparates und wird als reine HSP-Form ohne akzessorische Symptome definiert. Bis zu dem Zeitpunkt der Dissertationsverfassung war nicht über ein niedriges Gewicht bei Patienten berichtet worden. Nichtsdestotrotz wurde in dieser Arbeit, basierend auf den Ergebnissen ähnlicher HSP Mausstudien (z.B. Khundadze et al. 2013, Varga et al. 2015), ab einem bestimmten Mausalter das Körpergewicht einzelner Mauslinien über die Zeit bestimmt. Zur Körpergewichtsmessung wurden Wildtyp-Mäuse und heterozygote *Knockins* im Alter von 18 Wochen herangezogen. Die Mäuse wurden in einem nicht linearen Abstand von 4-16 Wochen über einen Zeitraum von 101 Wochen gewogen. Der Genotypenvergleich ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 18 dargestellt.

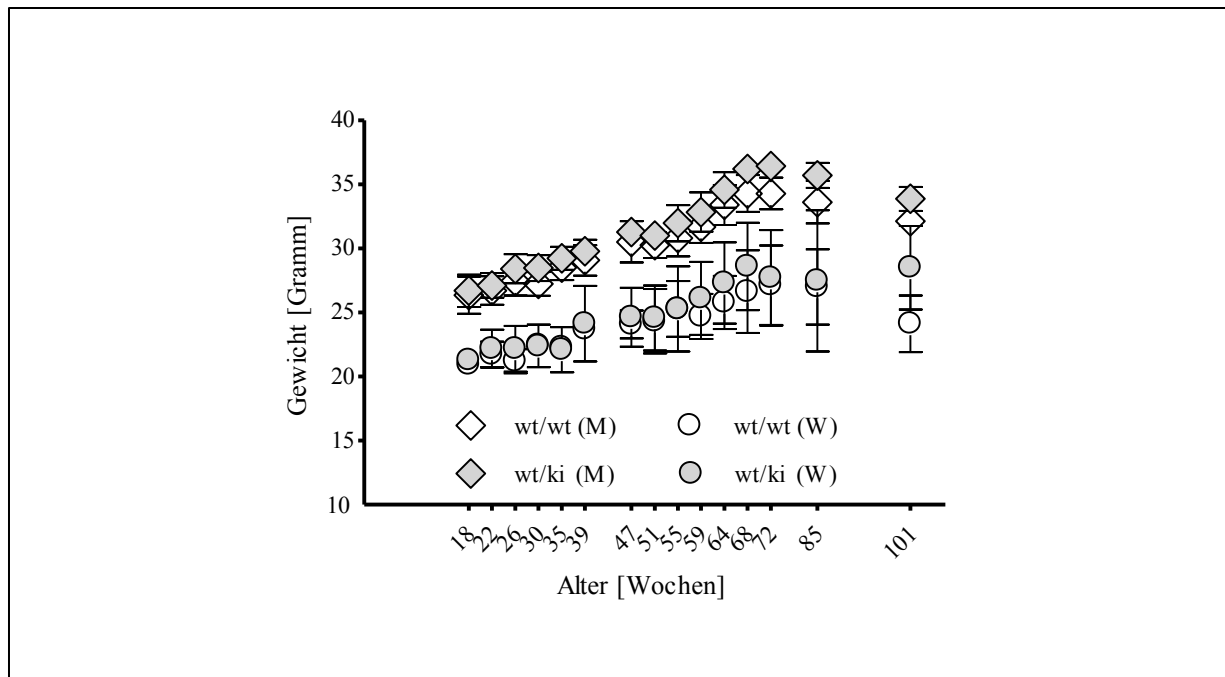


Abbildung 18: Gewichtsentwicklung der Wildtyp-Mäusen und heterozygoten *Knockins*. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). Statistische Analyse wurde mit 2way ANOVA und anschließend Bonferroni Test durchgeführt.

5.2.1.3 Quantifizierung der motorischen Beeinträchtigung

5.2.1.3.1. Messung des Fußbasenwinkels

Aufgrund des motorischen Phänotyps der humanen Erkrankung zielten die Untersuchungen auf den Bewegungsapparat ab. Zur Messung des Fußbasenwinkels wurden 10 Wildtyp- und 10 heterozygote *knockin* Mäuse herangezogen. Die Fußbasenwinkel-Messungen erfolgten bis in das relativ hohe Mausalter von 101 Wochen in einem nicht linearen Abstand von 4-16 Wochen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen wurden nicht nachgewiesen (Abb. 19).

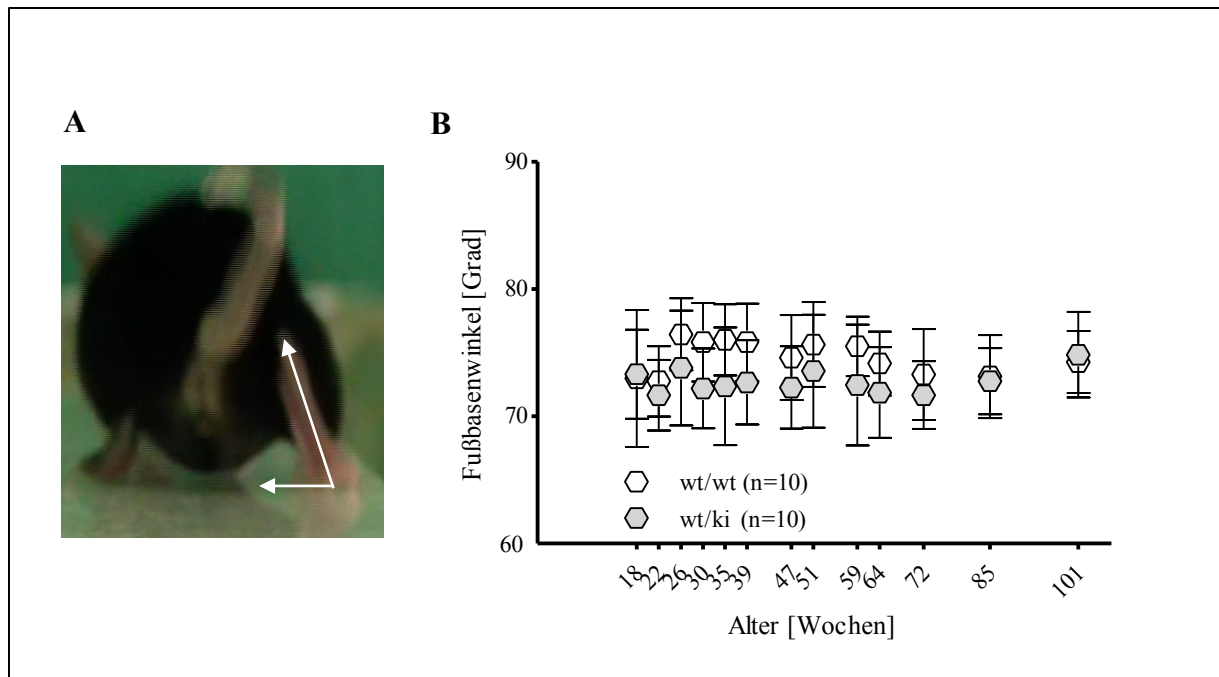


Abbildung 19: (A) Das Prinzip der Fußbasenwinkel-Messung. Der Moment, in dem der Fuß abhebt. (B) Ergebnisse der Fußbasenwinkel-Messung der Wildtyp-Mäuse und heterozygoten *Knockins* über die Zeit. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). Statistische Analyse wurde mit 2way ANOVA und anschließend Bonferroni Test durchgeführt.

5.2.1.3.2 Analyse mit Rotarod

Die Rotarod-Analyse wurde als Standardparameter für die Charakterisierung einer motorischen Beeinträchtigung der Mausmodelle für die HSP Typ SPG2, SPG4 und SPG7 verwendet (Griffiths et al. 1998, Ferrerinha et al. 2004, Tarrade et al. 2006, Kasher et al. 2009). In dieser Arbeit wurde eine beschleunigte Variante der Rotarodtestung an 10 Wildtyp- und 10 heterozygoten *knockin* Mäusen zu den verschiedenen Zeitpunkten über die Zeit angewandt. Der Genotypenvergleich ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Abbildung 20b zeigt die Daten der Rotarod-Analyse.

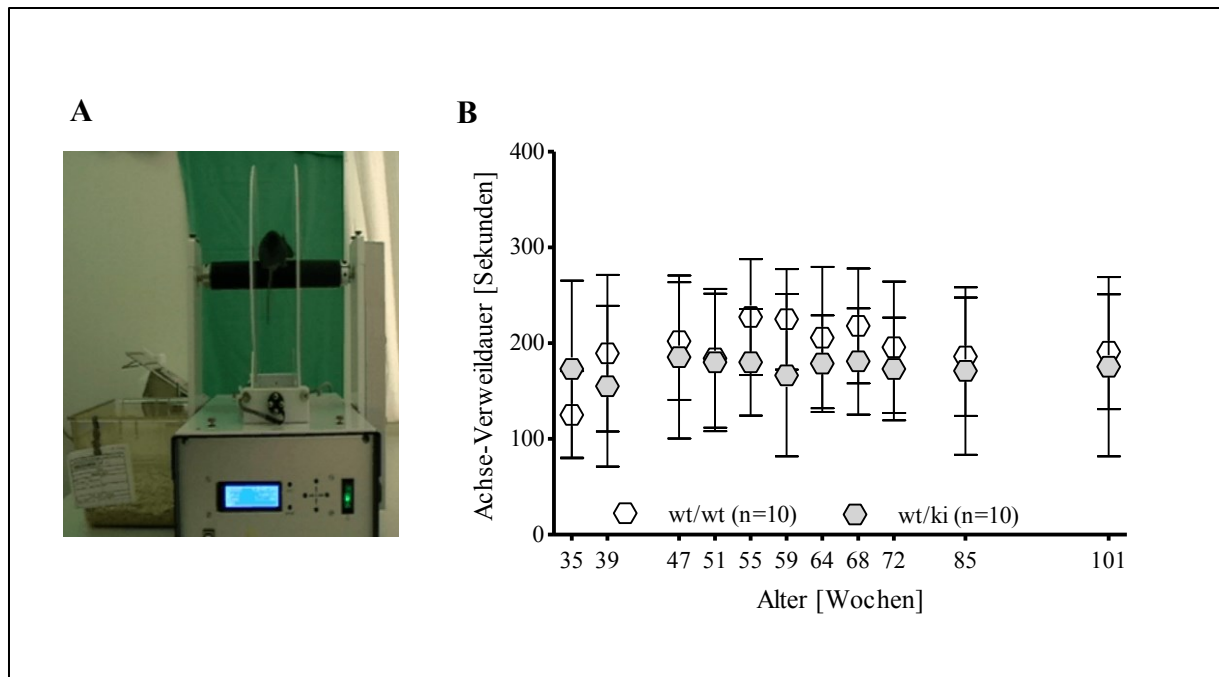


Abbildung 20: (A) Darstellung der Rotarod-Analyse. Die untersuchte Maus befindet sich auf einer sich rotierenden Achse. Die Achse-Verweildauer wird zeitlich erfasst. (B) Rotarod-Ergebnisse der Wildtyp-Mäuse und heterozygoten *Knockins*. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). Die statistische Analyse wurde mit 2way ANOVA und anschließender Bonferroni Testung durchgeführt.

5.2.1.4 Histopathologische Untersuchungen des Rückenmarks

Das histopathologische Korrelat zu dem motorischen HSP Phänotyp ist die Axondegeneration der kortikalen Neurone (Reid 1999). Als morphologische Konsequenz dieser Neurodegeneration wurden „axonale Schwellungen“ und/oder Axonverlust beschrieben (Griffiths et al. 1998, Ferreirinha et al. 2004, Tarrade et al. 2006, Beetz et al. 2013, Varga et al. 2015). Die Untersuchungen von Semidünnschnitten der heterozygoten *Knockins* zeigten im Alter von 108 Wochen keine der o.g. axonalen Veränderungen (Abb. 21).

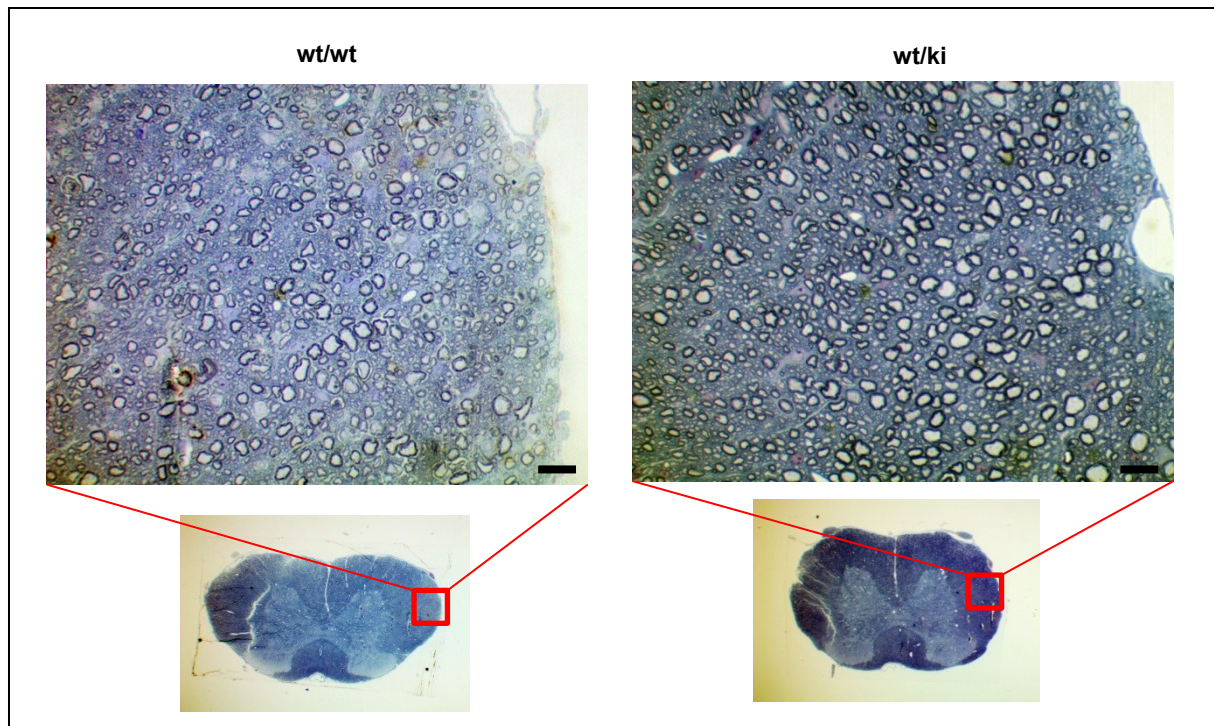


Abbildung 21: Semidünnschnitte von Kortikospinaltrakt im Lendenwirbelbereich einer Wildtyp-Maus (*wt/wt*) und eines heterozygoten *Knockins* (*wt/ki*) zeigen morphologisch keine Auffälligkeiten. Es wurden drei Mäuse je Genotyp untersucht. Maßstab Balken: 100 μ m.

5.2.1.5 Ex vivo Neuritenentwicklung in kortikalen Neuronen

Das neuropathologische Kennzeichen der HSP ist die Degeneration der Axone im Kortikospinaltrakt und Fasciculus gracilis, wobei der neuronale Zellkörper erhalten bleibt (Harding et al. 1983, Casari et al. 2001). Fink (2006) berichtete, dass das histopathologische Merkmal der HSP hauptsächlich durch eine Neuronendegeneration und nicht durch die gestörte Neuronenentwicklung charakterisiert ist. Nichtsdestotrotz wurden in einigen HSP Mausstudien (z.B. Renvoise et al. 2012, Beetz et al. 2013, Khundadze et al. 2013) die Daten zum Neuritenauswuchs an kultivierten primären Neuronen erhoben. Ähnliche Untersuchungen erfolgten an kortikalen Neuronen der SPG8 Wildtyp-Mäusen und heterozygoten *Knockins*. Der Genotypenvergleich ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 22b).

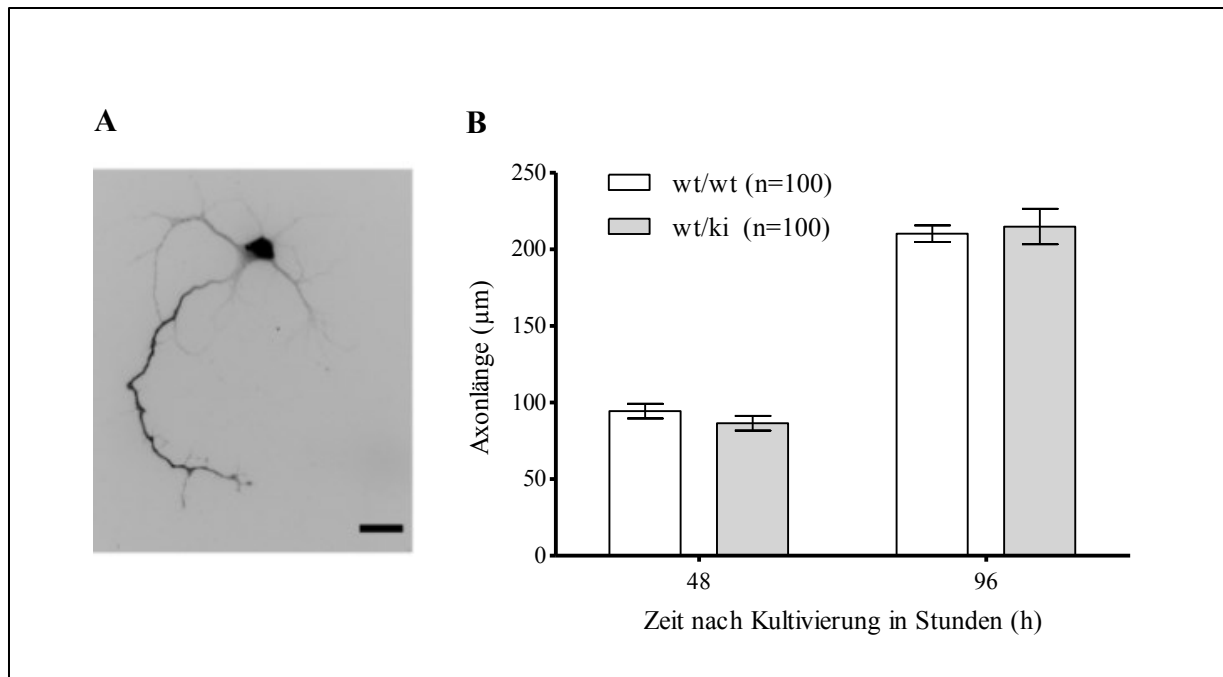


Abbildung 22: (A) Beispielaufnahme einer nach 96 Stunden fixierten und mit einem Axon spezifischen Antikörper markierten kortikalen Nervenzelle. Maßstabbalken: 20 µm. (B) *Ex vivo* Axonentwicklung der Wildtyp-Mäuse und heterozygoten *Knockins*. Ergebnisse der Axonlänge nach der Auswertung von 100 Zellen je Genotyp. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SD).

5.2.1.6 Genexpressionsanalyse aus Gehirngewebe

Missense Mutationen in einem Gen können die Inaktivierung des entsprechenden Gens nach sich ziehen. Deshalb wurden *KIAA0196* spezifische qPCR Primer generiert und die cDNA aus Gehirngewebe untersucht. In heterozygoten *Knockins* wurde keine Reduktion der Transkriptmenge nachgewiesen. Dasselbe zeigte auch die Genexpressionsanalyse von einzelnen WASH-Komplex (Wash1, Swip) und Retromer-Komplex (Vps35) Subeinheiten sowie vom direkten Strumpellin-Interaktionspartner VCP (Abb. 23).

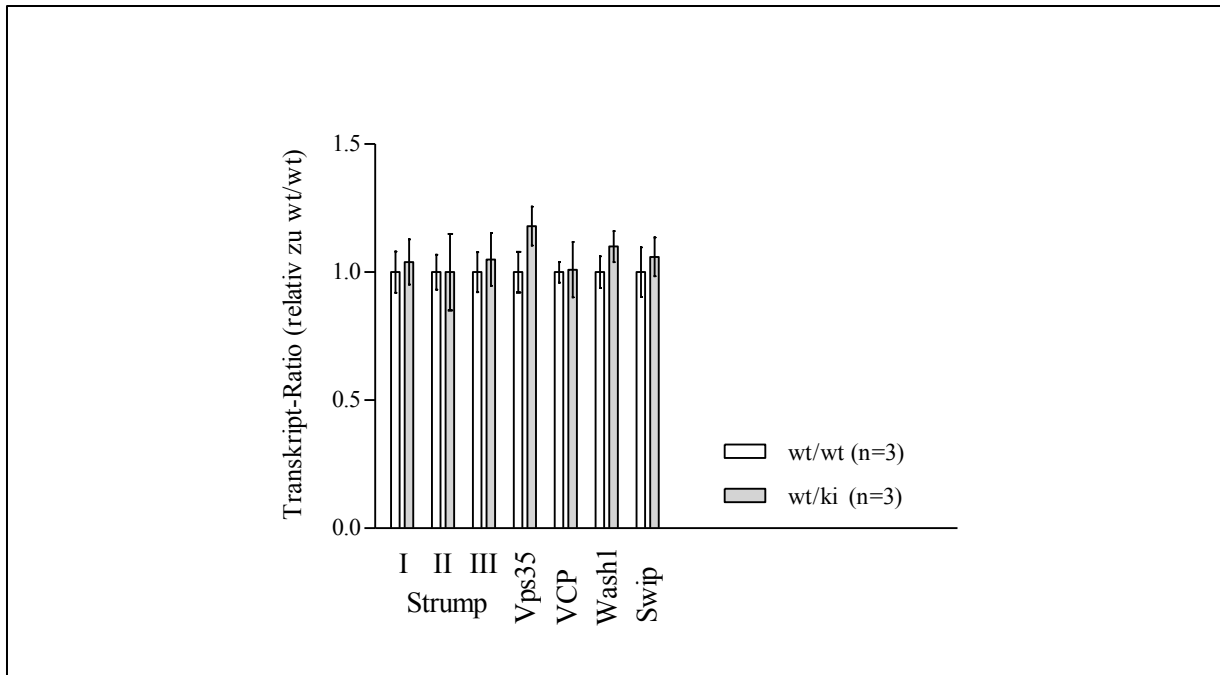


Abbildung 23: qPCR an cDNA aus Gehirnllysaten der Wildtyp-Mäuse (*wt/wt*) und heterozygoter *Knockins* (*wt/ki*). Strump: Strumpellin-Primer I, II und II entsprechen den Primerpositionen in den Exonen 7-8, 11-12 und 23-24, jeweils. Für Vps35, VCP, Wash1 und Swip wurde je ein Primerpaar benutzt. Die Daten repräsentieren das geometrische Mittel von 3 Tieren je Genotyp. Zur Normalisierung der Daten wurde das Haushaltsgen Tubulin Beta 3 (TUBB3) benutzt. Fehlerbalken repräsentieren SEM.

5.2.2 Charakterisierung der *knockout* Linie

5.2.2.1 Kreuzung und Lebensfähigkeit

Zur Klärung des funktionellen Mechanismus für das *KIAA0196* Genprodukt Strumpellin wurde eine *knockout* Linie über Vorarbeiten bereitgestellt und die Lebensfähigkeit vom heterozygoten *Knockout* bis in das relativ hohe Mausalter (72 Wochen) nachgewiesen. Die Lebensfähigkeit homozygoter *knockout* Mäuse konnte noch nicht beurteilt werden. Im Alter von 8 Wochen begannen wir mit der Kreuzung heterozygoter *Knockouts*, mit je einem Männchen und zwei Weibchen. Diese Zucht resultierte in der Geburt von 37 Jungtieren. Keines der 37 Nachkommen war homozygot (Tab. 6). In der Abbildung 24 ist nur ein Teil der Genotypisierungsergebnisse dieser Verpaarungen gezeigt.

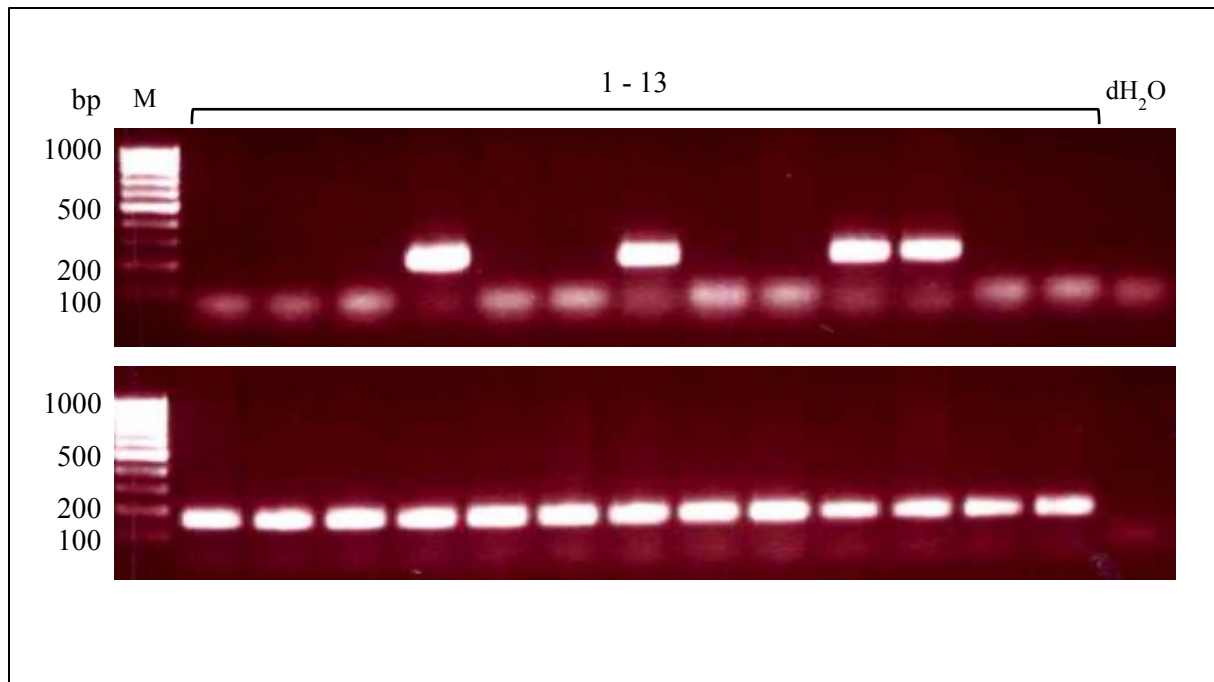


Abbildung 24: Ergebnisausschnitt einer Genotypisierung nach Verpaarung heterozygoter *Knockouts* (wt/ko vs. wt/ko). Die obere Bildhälfte repräsentiert das Amplifikat aus dem *Knockout*-Allel, 202 bp (Primer: Intron11_F vs. Intron12_R). Die untere Bildhälfte repräsentiert das Amplifikat aus dem Wildtyp-Allel, 158 bp (Primer: Intron11_F vs. Intron11_R). Die Positionen 4, 7, 10 und 11 repräsentieren heterozygote *Knockouts*, die restlichen Positionen repräsentieren Wildtyp-Mäuse (gezählt von links nach rechts). bp: Basenpaare. M: Größenstandard (100 bp Marker). dH₂O: negative Wasserkontrolle.

Auch im embryonalen Alter E19.5, E16.5 und E13.5 wurden keine homozygoten *knockout* Embryonen nachgewiesen (Tab. 6). Die Anzahl der Wildtyp- und heterozygoten *knockout* Mäuse entsprach der erwarteten 1:2 Ratio. Diese Genotypenverteilung erfüllte die Mendelschen Regeln.

An dieser Stelle ist die Frage „Ob bei der Befruchtung die Zellen mit homozygotem Genotyp entstehen, und wenn ja, dann, in welchem embryonalen Alter sterben homozygote *Knockouts* ab und warum“ sicherlich berechtigt. Diese Frage soll im Rahmen einer weiteren Studie geklärt werden.

Tabelle 6: Ergebnisse aus den Verpaarungen heterozygoter *knockout* Tiere untereinander.

Genotyp der Nachkommen/Embryonen				
Alter	wt/wt	wt/ko	ko/ko	p-Wert
P1	12	25	0	$2,4 \times 10^{-5}$
E19.5	2	3	0	0,23
E16.5	3	8	0	0,042
E13.5	4	6	0	0,056
Summe	21	42	0	$1,3 \times 10^{-8}$
Ratio	1	2	0	

Ein homozygoter *Knockout* des *KIAA0196* Maushomologs ließ sich weder im Jungtier-Alter (z.B. P14) noch im embryonalen Alter (z.B. E13.5) nachweisen. *wt/wt*=Wildtyp, *wt/ko*= heterozygoter *Knockout*, *ko/ko*=homozygoter *Knockout*. E13.5=13,5 Tage nach dem Geschlechtsverkehr (*post coital*).

5.2.2.2 Körpergewicht

Ähnlich zu dem Strumpellin *knockin* Modell und auch den *knockout* Mausmodellen für HSP Typ SPG11 (Varga et al. 2015) und SPG15 (Khundadze et al. 2013) wurde das Körpergewicht heterozygoter Strumpellin *Knockouts* zu verschiedenen Alterszeitpunkten erfasst. Dafür wurden Geschwistertiere (wildtyp vs. heterozygoter *knockout*) im Alter von 28 Wochen herangezogen, je 10 Tiere pro Genotyp (5 Männchen und 5 Weibchen). Nach der endgültigen Auswertung wurde kein statistisch signifikanter Genotypenunterschied nachgewiesen, die Ergebnisse sind in Abbildung 25 geschlechtsbezogen dargestellt.

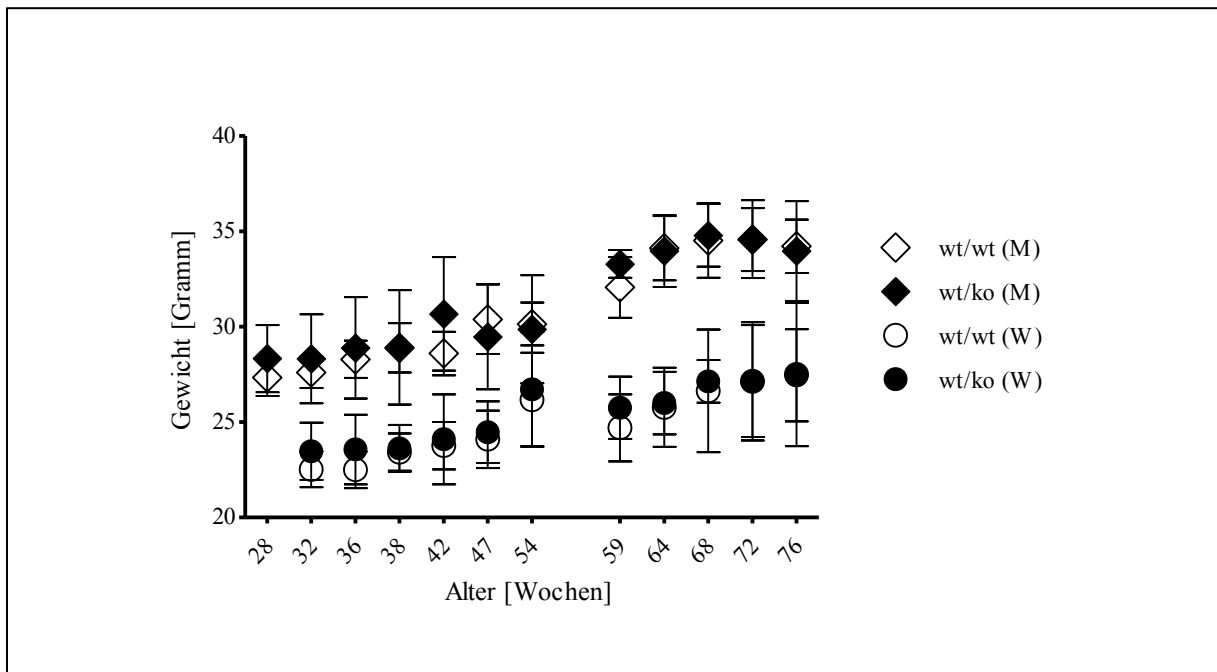


Abbildung 25: Gewichtsergebnisse der Wildtyp-Mäuse und heterozygoten *Knockouts*. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). Die statistische Analyse wurde mit 2way ANOVA und anschließend Bonferroni Testung durchgeführt. *wt/wt*: Wildtyp, *wt/ko*: heterozygoter *Knockout*, M: Männchen, W: Weibchen.

5.2.2.3 Quantifizierung der motorischen Beeinträchtigung

5.2.2.3.1. Messung des Fußbasenwinkels

In den Mausmodellen für HSP Typ SPG11, SPG15 und SPG31 zeigte sich die Messung des Fußbasenwinkels als ein sehr sensibler Parameter für die Erfassung des motorischen Phänotyps (Beetz et al. 2013, Khundadze et al. 2013, Varga et al. 2015). Diese quantitative Bewertung erfolgte auch an SPG8 Geschwistermäusen (wildtyp vs. heterozygoter *knockout*). Über einen definierten Zeitraum wurden jeweils 9 Mäuse je Genotyp untersucht. Dabei

wurden keine statistisch signifikanten Genotypenunterschiede nachgewiesen. In der Abbildung 26b sind die Daten gezeigt.

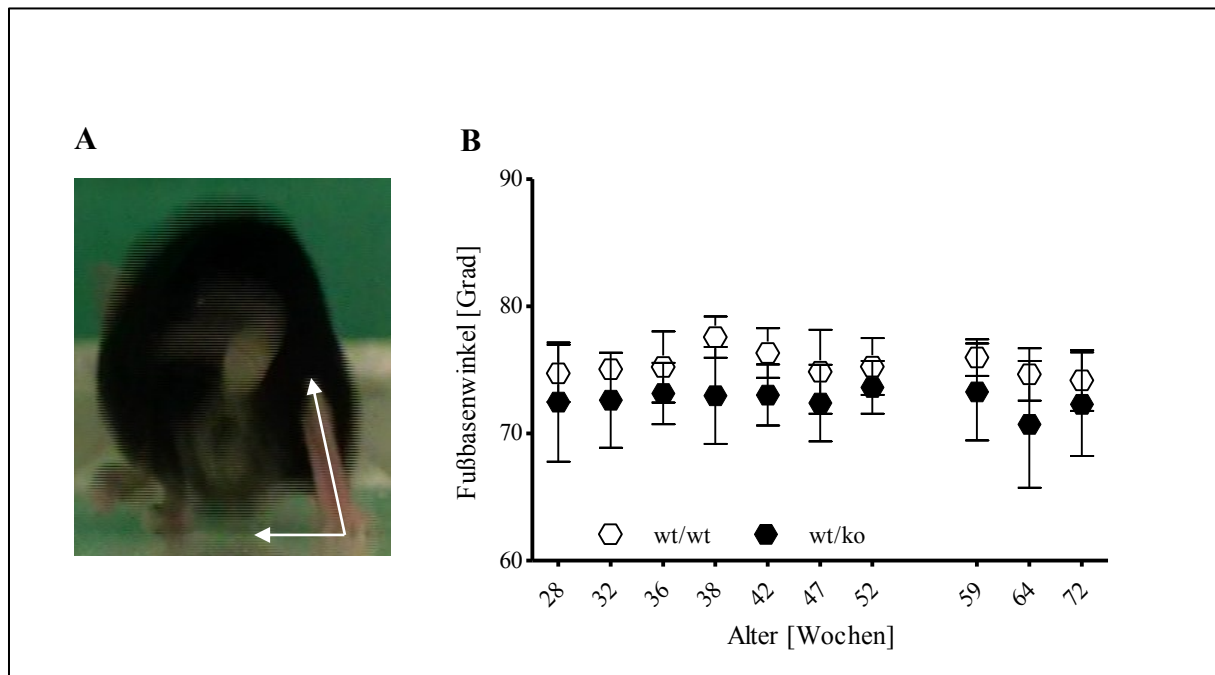


Abbildung 26: (A) Schematische Darstellung der Fußbasenwinkel-Messung. (B) Ergebnisse der Fußbasenwinkel-Messung der Wildtyp-Mäuse und heterozygoten *Knockouts*. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). Die statistische Analyse wurde mit 2way ANOVA und anschließend Bonferroni Testung durchgeführt.

5.2.2.3.2 Analyse mit Rotarod

Alternativ zu der Messung des Fußbasenwinkels kann die Analyse mit Rotarod zur quantitativen Bewertung des motorischen Phänotyps benutzt werden. Die Rotarod-Analyse wurde erfolgreich in den Mausmodellen für HSP Typ SPG2, SPG4, SPG7, SPG11, SPG20, SPG35 und SPG54 angewandt (Griffiths et al. 1998, Ferreirinha et al. 2004, Tarrade et al. 2006, Kasher et al. 2009, Potter et al. 2011, Renvoise et al. 2012, Inloes et al. 2014, Varga et al. 2015). Für diese Dissertationsarbeit wurden zwei Kohorten im Alter von 28 bis 52 Wochen (junge Kohorte, wildtyp vs. heterozygoter *knockout*) und im Alter von 59 bis 76 Wochen (alte Kohorte, wildtyp vs. *knockout*) untersucht. Dabei zeigten einzelne Mäuse innerhalb eines Genotyps und innerhalb einer Kohorte große Streuung der erfassten Daten. Nichtsdestotrotz sind die Daten in Abbildung 27b gezeigt. Ein statistisch signifikanter Genotypenunterschied wurde für beide Kohorten nicht festgestellt.

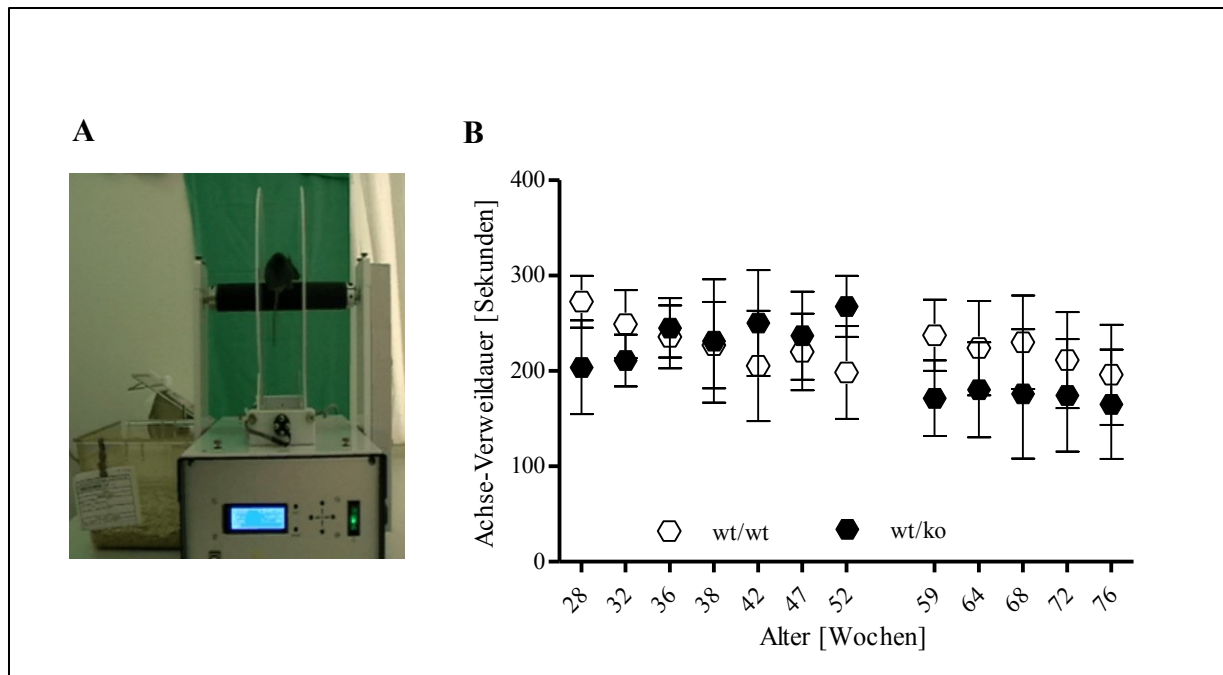


Abbildung 27: (A) Schematische Darstellung der Datenerfassung für die Rotarod-Analyse. (B) Rotarod-Ergebnisse der Wildtyp-Mäuse und heterozygoten *Knockouts*. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD). Die statistische Analyse wurde mit 2way ANOVA und anschließend Bonferroni Testung durchgeführt.

5.2.2.4 Ex vivo Neuritenentwicklung in kortikalen Neuronen

Am Tag 1 nach der Kultivierung zeigen primär kultivierte Neurone mehrere die Länge betreffend fast identische Zellausläufer. Am Tag 2 beginnt ein von den Zellausläufern deutlich schneller zu wachsen und kann schon hier als Axon definiert werden. Eindeutig wird dieser Längenunterschied am Tag 3 nach der Kultivierung (Dotti et al. 1988).

Primäre Kulturen der SPG1, SPG10 und SPG15 *Knockout* Neurone zeigten einen verzögerten axonalen Auswuchs bzw. verminderte Axonlänge (Dahme et al. 1997, Karle et al. 2012, Khundadze et al. 2013). Primäre Kulturen der SPG20 *Knockout* Neurone zeigten eine vergrößerte Axonlänge während die SPG4, SPG21 und SPG31 *Knockout* Neurone vergleichend mit Wildtyp-Neuronen keinen Unterschied im Axonauswuchs zeigten (Tarrade et al. 2004, Soderblom et al. 2010, Renvoise et al. 2012, Beetz et al. 2013). Weiterhin zeigten die SPG4 und SPG10 primären *Knockout* Neurone vermehrt axonale Schwellungen während die SPG21 *Knockout* Neurone vermehrt Axonverzweigungen/-kollateralen aufwiesen.

Die Analyse der Axonlänge in den kortikalen Neuronen der Strumpellin Mäuse (wildtyp vs. heterozygoter *Knockout*) zeigte keinen Unterschied (Abb. 28b). Auch die Anzahl der Axonkollateralen blieb ohne signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (Jahic et al. 2015).

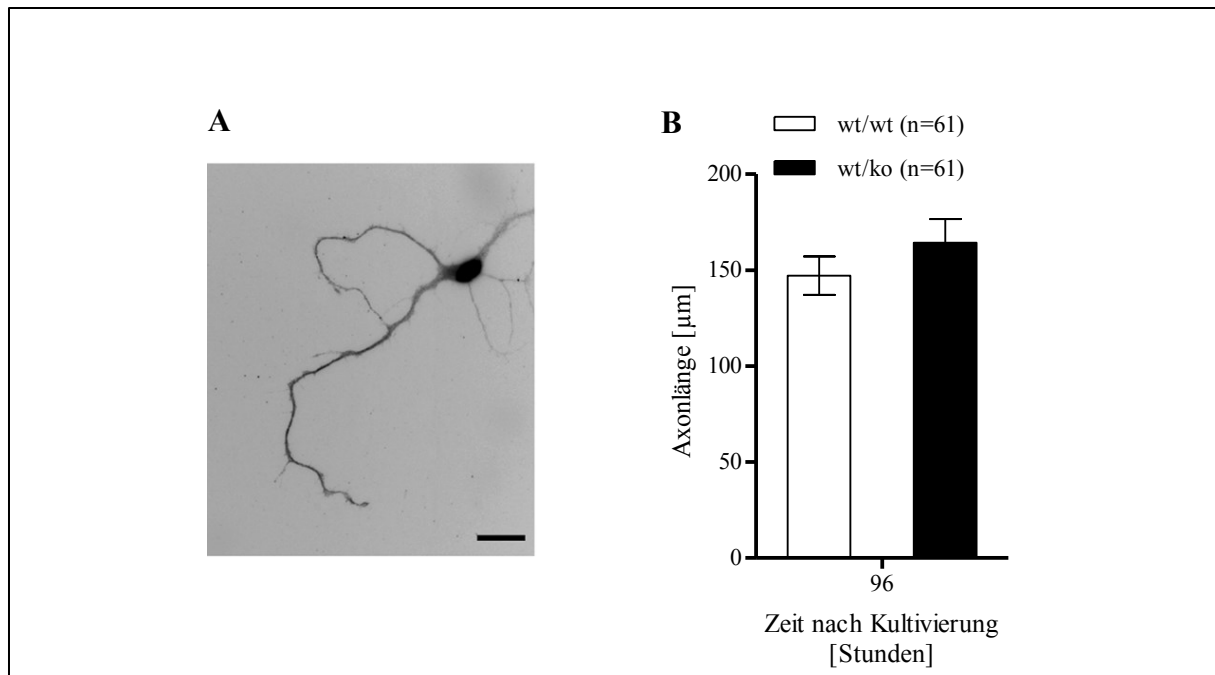


Abbildung 28: (A) Beispielaufnahme einer primären kortikalen Nervenzelle 96 Stunden nach Kultivierung. Maßstabsbalken: 20 µm. (B) Quantifizierung der *ex vivo* Axonentwicklung der SPG8 Wildtyp-Mäuse und heterozygoten *Knockouts*. Die Ergebnisse der Axonlänge nach der Auswertung von 61 Zellen je Genotyp. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SD). Die statistische Analyse wurde mit 2way ANOVA und anschließend Bonferroni Testung durchgeführt.

5.2.2.5 *Ex vivo* Untersuchung von endo-, lyso. und autophagosomalen Kompartimenten in Fibroblasten adulter Mäuse

Die Identifizierung von HSP Genen erlaubt erste indirekte Rückschlüsse auf die pathophysiologischen Mechanismen. Komplexe intrazelluläre HSP Pathomechanismen sind beschrieben worden: Störungen axonaler Signalwirkung und Signalwege in SPG1 (Castellani et al. 2004, Bechara et al. 2008), Störungen der Axonmyelinisierung hervorgerufen durch Oligodendrozyten modulierte Aktivität der zellulären Motorproteine in SPG2 (Gruenenfelder et al. 2011), durch Fehlfunktion der Ionen-Kanäle in Oligodendrozyten in SPG44 (Orthmann-Murphy et al. 2009) und die Oxidationsstörungen freier Fettsäuren in SPG35 (Dick et al. 2010, Schneider und Bhatia 2010), Störungen im axonalen Transport in SPG10 (Reid et al. 2002, Ebbing et al. 2008), Störungen der Formgebung verschiedener Organellen wie z.B. endoplasmatisches Retikulum in SPG3A, SPG4, SPG12, SPG17, SPG18 und SPG31 (Pearce et al. 2009, Park et al. 2010, Alazami et al. 2011, Yagi et al. 2011, Montenegro et al. 2012, Beetz et al. 2013), Störungen der neuronalen Lipiddistribution in SPG17 und SPG20 (Cui et al. 2011, Fei et al. 2011a, Fei et al. 2011b, Eastman et al. 2009, Edwards et al. 2009, Hooper et al. 2010) und des Lipidmetabolismus in SPG5 (Schüle et al. 2010), Störungen mitochondrialer Funktionen in SPG7 und SPG13 (Ferreirinha et al. 2004, Bross et al. 2008), endosomaler Funktionen in SPG11, SPG15 und SPG48 (Hirst et al. 2013, Khundadze et al.

2013) und lysosomaler Funktionen in SPG11 und SPG15 (Chang et al. 2014, Renvoisé et al. 2014, Varga et al. 2015).

Durch *ex vivo* Analysen an Maus Embryonalen Fibroblasten (MEF) konnte erhöhte Akkumulation von Lipiddroplets in SPG20 *Knockout* MEFs festgestellt werden (Renvoise et al. 2012). Die SPG11 *Knockout* MEFs zeigten eine verminderte Lysosomen-Regeneration aus Autolysosomen (Varga et al. 2015). Darüber hinaus konnten Störungen folgender subzellulärer Systeme beschrieben werden: Mikrotubuli (SPG4), Mitochondrien (SPG7, SPG10), Endo-/Lysosomen (SPG11, SPG15), endoplasmatisches Retikulum (SPG31) (Tarrade et al. 2006, Ferreira et al. 2004, Nolden et al. 2005, Xia et al. 2003, Karle et al. 2012, Khundadze et al. 2013, Beetz et al. 2013, Varga et al. 2015).

In primären Maus-adulten-Fibroblasten (MAFs) der Strumpellin Mäuse (wildtyp und heterozygote *Knockouts*) wurden Endosomen und Lysosomen mit spezifischen Antikörpern markiert. In heterozygoten *knockout* MAFs wurden keine augenscheinlichen Veränderungen entsprechender Zellorganellen in Bezug auf Organellengröße oder deren subzelluläre Verteilung festgestellt (Abb. 29). Auch die Transfektion eines Fluoreszenz-markierten Fusionsproteins mit dem autophagosomalen Marker LC3 zeigte morphologisch keine auffälligen Unterschiede zwischen wildtyp und heterozygoten *knockout* MAFs (Abb. 29). Jedoch wurden in dieser Arbeit die Zellen im Basiszustand, d.h. ohne Autophagieinduktion, untersucht. In einer anstehenden Studie sollen Strumpellin MAFs bzw. die o.g. Zellorganellen nach Induktion der Autophagie morphologisch untersucht werden.

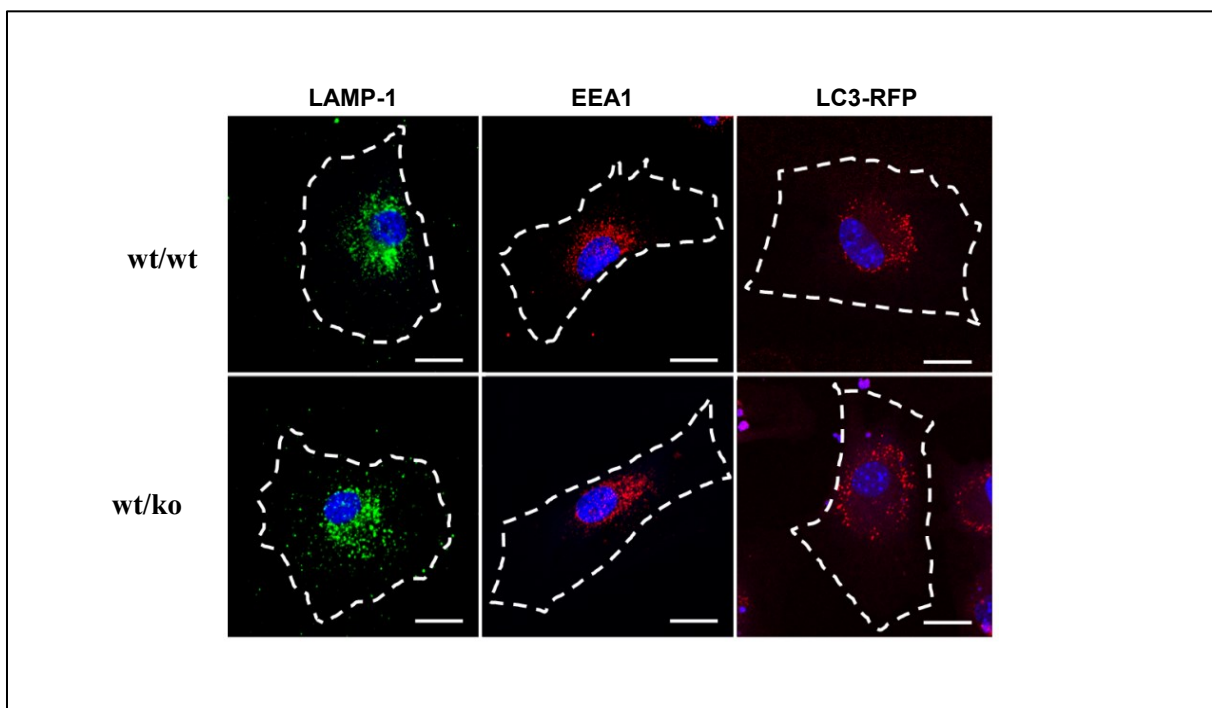


Abbildung 29: Darstellung von Lysosomen (LAMP-1), *early* Endosomen (EEA1) und Autophagosomen/Autolysosomen (LC3-RFP) mittels Immunofluoreszenz (LAMP-1, EEA1) und

Transfektion eines selbstfluoreszierenden Markers (LC3-RFP) in primären Fibroblasten adulter Mäuse. Maßstabbalken: 20 μm .

In vitro Inaktivierung von Strumpellin in HeLa Zellen führt zur Bildung von tubulären für SNX1 und VPS26 Retromer-Proteine positiven Strukturen an *early*-Endosomen (Harbour et al. 2012). In diesem Zusammenhang wurden MAFs von wildtyp und heterozygoten *knockout* Strumpellin-Mäusen kultiviert und entsprechende Zellstrukturen mittels Immunfluoreszenz mit spezifischem SNX1 Antikörper untersucht. Der Zellanteil mit mindestens einem Tubulus wurde von 30-40 Zellen in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Dabei wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen beobachtet (Abb. 30).

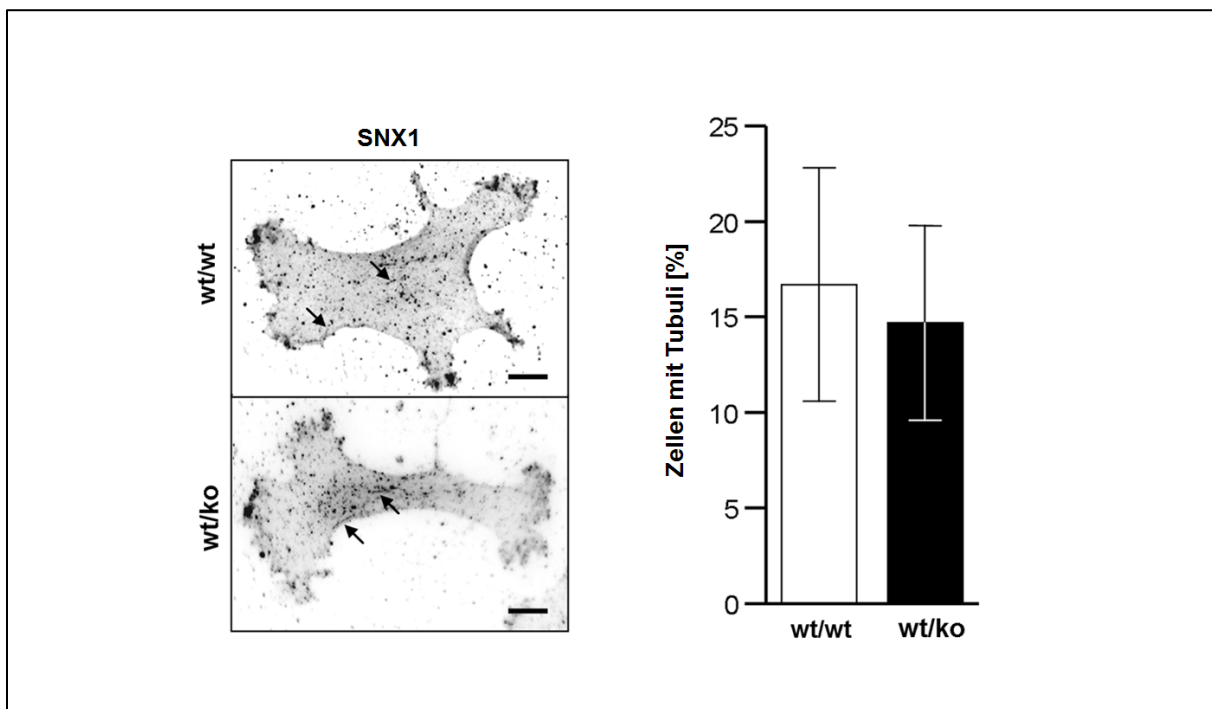


Abbildung 30: Darstellung endosomaler Tubuli (Pfeile) in primären MAFs mittels Immunfluoreszenz und nach Färbung mit SNX1 Antikörper. Maßstabbalken: 10 μm . Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SD). Die Abbildung wurde aus Jahic et al (2015) übernommen und modifiziert.

5.2.2.6 Genexpressionsanalyse aus Gehirngewebe

Heterozygote Geninaktivierung kann als Konsequenz eine Hochregulation der Genexpression im Wildtyp-Allel haben. Deshalb wurden *KIAA0196* spezifische qPCR Primer generiert und die cDNA aus Gehirngewebe untersucht. Das Ergebnis, die ~50% Reduktion vom gesamten *KIAA0196* Transkript (Abb. 31) in heterozygoten *Knockouts*, zeigt, dass keine Kompensation im Wildtyp-Allel auf mRNA Ebene stattfindet.

Die Genexpressionsanalyse von einzelnen WASH-Komplex (Wash1, Swip, Fam21) und Retromer-Komplex (Vps35) Subeinheiten sowie vom direkten Strumpellin-Interaktionspartner VCP zeigt keine Veränderungen in heterozygoten *Knockouts*. Das

bedeutet, die Reduktion vom gesamten *KIAA0196* Transkript resultiert nicht in der Reduktion der Transkriptmenge einzelner WASH- und Retromer-Komplex Subeinheiten bzw. Strumpellin-Interaktionspartner (Abb. 31).

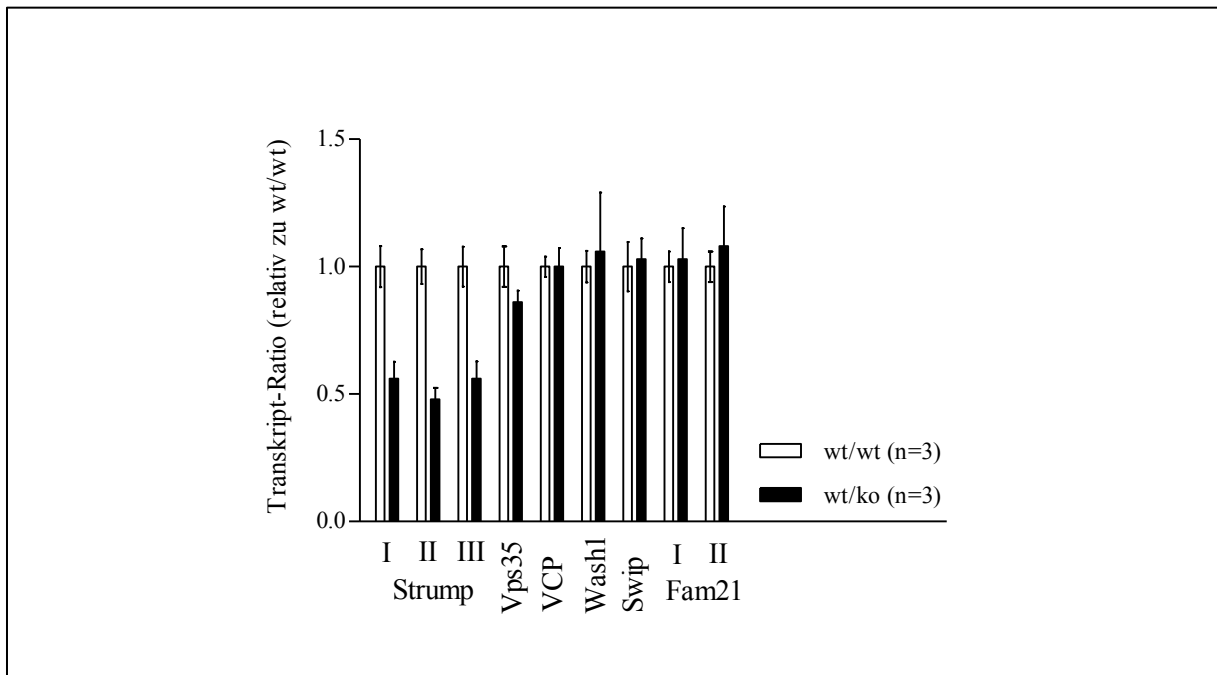


Abbildung 31: qPCR an cDNA aus Gehirnlysaten der Wildtyp-Mäuse (*wt/wt*) und heterozygoter *Knockouts* (*wt/ko*). Strump: Strumpellin-Primer I, II und II entsprechen den Primerpositionen in den Exonen 7-8, 11-12 und 23-24, jeweils. Fam21-Primer I und II entsprechenden den Primerpositionen in den Exonen 22-23 und 30-31, jeweils. Für Vps35, VCP, Wash1 und Swip wurde je ein Primerpaar benutzt. Die Daten repräsentieren das geometrische Mittel von 3 Tieren je Genotyp. Zur Normalisierung der Daten wurde das Haushaltsgen Tubulin Beta 3 (TUBB3) benutzt. Fehlerbalken repräsentieren SEM.

5.2.2.7 Strumpellin und FAM21 Westernblot-Analyse von Gehirnlysaten

Die erhöhte Proteinstabilität wird als ein weiterer kompensatorischer Mechanismus der heterozygoten Geninaktivierung diskutiert (Freeman et al. 2013). Deshalb wurden vorhandene Gehirnlysate auf die Proteinmenge von Strumpellin und zusätzlich Fam21 mittels Westernblot untersucht. Eine Verminderung von Strumpellin Protein wurde nachgewiesen (Abb. 32). Dasselbe wurde auch für das FAM21 Protein festgestellt (Abb. 32). Das bedeutet, die Reduktion von Strumpellin Protein resultiert in der Destabilisierung des WASH-Komplexes, was eine Proteinreduktion einzelner WASH-Komplex Subeinheiten (z.B. Fam21) nach sich zieht.

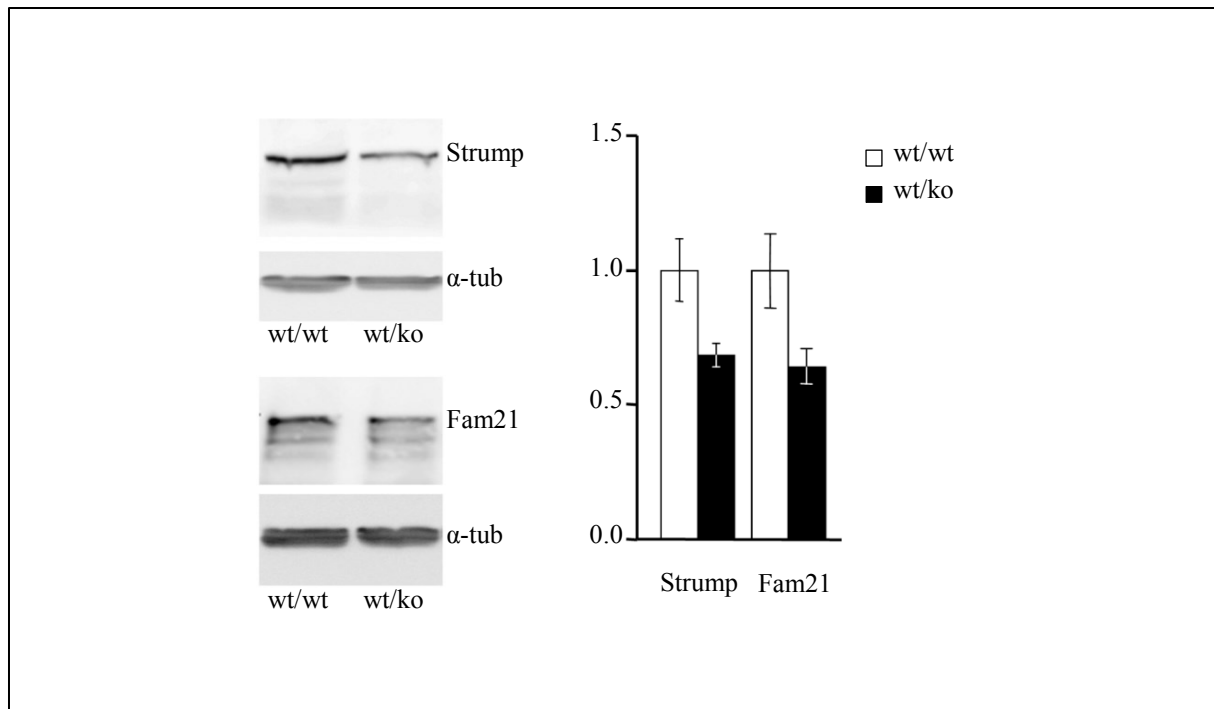


Abbildung 32: Westernblot basierte Quantifizierung von Strumpellin (Strump) und Fam21 in Gehirnlysaten der Wildtyp-Mäuse (*wt/wt*) und heterozygoten *Knockouts* (*wt/ko*). Die Daten repräsentieren den Mittelwert von 3 Tieren je Genotyp. Zur Normalisierung der Daten wurde das Haushaltsgen Alpha Tubulin (α -tub) benutzt. Fehlerbalken repräsentieren SEM. Die Abbildung wurde aus Jahic et al (2015) übernommen und modifiziert.

6. Diskussion

6.1 Generierung der Mauslinien

Die Generierung genetisch modifizierter Mäuse ermöglicht es, die physiologische und pathophysiologische Rolle von Genen genauer zu charakterisieren. Prinzipiell besteht die Möglichkeit auf vier verschiedenen Wegen durch genetische Manipulationen das Mausgenom zu verändern. Zum Einen die zufällige Integration exogener Gene („klassisches“ Transgen) mit dem Ziel, dass dieses Gen im Organismus des „Empfängertieres“ exprimiert und in das entsprechende Protein translatiert wird. Zum Zweiten das „Gentrapping“ bzw. die ungezielte Einbringung verschiedener Selektionskassetten in Intronbereiche, so dass Exone, die 3' der Integrationsstelle liegen nicht länger translatiert werden. Zum Dritten die gezielte Genmodifikation, die sich der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen bedient, um ein endogenes Gen zu verändern („Gentargeting“). Diese Methode kann verwendet werden, um Gene durch z.B. Entfernung einzelner Exone auszuschalten (*knockout*: konstitutiv oder konditional) oder andere Genmutationen (z.B. *missense*) in das Mausgenom einzuführen (*knockin*) (Thomas und Capecchi 1987, Mansour et al. 1988). Die vierte Möglichkeit das Mausgenom zu verändern, stellt das CRISPR/Cas-System dar. Damit können Gene eingefügt oder ausgeschaltet aber auch einzelne Nukleotide in Genen verändert werden („Genediting“) (Jinek et al. 2012, Ochiai 2015). Die Voraussetzung für die Generierung genetisch modifizierter Mäuse mittels der ersten und der dritten Methode ist die Konstruktion des entsprechenden Vektors. Dies kann mehrere Monate in Anspruch nehmen. Dagegen erlaubt das CRISPR/Cas-System die Generierungszeit von genetisch modifizierten Mäusen von mehreren Monaten auf wenige Wochen zu verkürzen (Wang et al. 2013).

Zu Beginn dieser Dissertationsarbeit war die genetische Modifizierung des Mausgenoms mittels des CRISPR/Cas-Systems noch nicht etabliert, somit wurde in dieser Arbeit das „Gentargeting“ als Methode angewandt, um die Mäuse mit genetisch modifiziertem SPG8 Locus zu generieren. Dabei wurde ein PCR basierter Vektoraufbau benutzt. Es wurde ein System gewählt, in welchem nicht nur ein *Knockin*, sondern gleichzeitig auch ein *Knockout* (konstitutiv und konditional) von Strumpellin generiert werden kann.

Eine der Voraussetzungen für das erfolgreiche Gentargeting über homologe Rekombination ist die optimale Länge der Homologiebereiche im Targeting-Konstrukt, von möglichst mindestens 5 kb bis höchstens 15 kb (Thomas und Capecchi 1987, Hasty et al. 1991). Ursprünglich wurden drei Punktmutationen im SPG8 Locus (*KIAA0196*) jeweils in Exon 11 (p.N471D), Exon 14 (p.L619F) und Exon 15 (p.V626F) beschrieben (Valdmanis et al. 2007). Unser Screen einer Lambda Phage-Bibliothek ergab ein Fragment muriner cDNA, das Exone

10 bis 15 sowie Teile der angrenzenden Exone 9 und 16 beinhaltet. Somit besaß der SPG8-Targetingvektor Rekombinationsarme von ca. 4,5 kb des 5'- und ca. 2,6 kb des 3'-flankierenden Bereiches des SPG8 Gens. Um eine möglichst optimale Homologie im SPG8-Targetingvektor zu gewährleisten, fiel unsere Entscheidung auf die Generierung einer *knockin* Linie für die Mutation im Exon 11 (in Maus Exon 12). Über mehrere Klonierungsschritte wurde der Gentargeting-Vektor mit folgenden Veränderungen hergestellt: (i) *Neomycin*-Kassette geflankt von *frr*-Sequenzen und einer 5' *LoxP*-Sequenz im Intron 11, (ii) singuläre 3' *LoxP*-Sequenz im Intron 12, (iii) Basenaustausch im Exon 12, der in dem *missense* Austausch p.N471D resultiert und damit eine humanpathogene Mutation darstellt. Diese Strategie, nämlich das Einfügen von zwei *LoxP*-Sequenzen mit einer dazwischen von *frr*-Sequenzen geflankten *Neomycin*-Kassette, erlaubt nach der Verpaarung der Chimären mit *Flp*- bzw. *Cre-Deletern* die Generierung sowohl von konditionalem als auch konstitutivem *Knockout*. Bei der konstitutiven *knockout* Line wird ein essenzielles Gensegment dauerhaft zerstört, wodurch die Genfunktion in allen Mauszellen verloren geht. Solche Mausmodelle versterben häufig schon im Embryonalstadium oder kurz nach der Geburt. Im Gegensatz dazu können in einem konditionalen *knockout* Mausmodell, in dem die Geninaktivierung zeitlich- und gewebespezifisch erfolgt, letale Defekte vermieden werden (Lukowski et al. 2005).

6.2 Charakterisierung der *knockin* Linie

In dieser Arbeit wurde ein *KIAA0196* Maushomolog Allel mit einem Basenaustausch im Exon 12 generiert, der in dem *missense* Austausch p.N471D resultiert und damit einer humanpathogenen Mutation entspricht. Der entsprechende heterozygote/homozygote Basenaustausch wurde auch auf der cDNA Ebene nachgewiesen, und die quantitative PCR zeigte keine Veränderung der Transkriptmenge in heterozygoten *Knockins*. Somit wird das *missense* mutierte Protein regulär exprimiert. Die Mutationen einer dominant vererbten Erkrankung können über (i) eine Haploinsuffizienz (eng. classic loss-of-function), (ii) einen dominant negativen Effekt von mutiertem auf das gesunde Allel und somit einen kompletten Funktionsverlust (eng. complete loss-of-function) oder (iii) eine toxische Veränderung der Proteinfunktion (eng. toxic gain-of-function) wirken. Das Ausschalten von Strumpellin in Zebrafisch resultiert in einem Axon-Auswuchs Phänotyp (Valdmanis et al. 2007, Clemen et al. 2010). Dieser Phänotyp wurde durch die Injektion humaner Wildtyp cDNA aufgehoben, jedoch nicht durch die Injektion mutierter humaner cDNA, mit den Mutationen p.L619F oder p.V626F (Valdmanis et al. 2007). Dieses Ergebnis könnte für eine Haploinsuffizienz der *missense* Mutationen im Strumpellin sprechen. Jedoch wurden Daten zu *missense* Mutation

p.N471D in der entsprechenden Studie nicht gezeigt. Die Haploinsuffizienz als Mutationsmechanismus ist in zwei dominant vererbten HSP Formen, SPG4 und SPG31, gut etabliert und die entsprechenden Mausmodelle zeigen progrediente Bewegungseinschränkung sowie histopathologische Auffälligkeiten wie z.B. geschwollene Axone der relevanten Rückenmarksregionen (Tarrade et al. 2006, Kasher et al. 2009, Beetz et al. 2013). Im Gegensatz dazu zeigen heterozygote Strumpellin *Knockins* (p.N471D) weder motorische noch histopathologische Auffälligkeiten. In den Experimenten am Zebrafisch und Neuroblastomzellen, beides hat das Ausschalten von Strumpellin als Konsequenz, wurde ein verminderter Axonauwuchs gezeigt (Valdmanis et al. 2007, Clemen et al. 2010). Die Untersuchungen an primär kultivierten kortikalen Neuronen der heterozygoten *Knockins* zeigten jedoch keinen Unterschied der Neuritenentwicklung im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen. Die Überexpression der durch Valdmanis et al (2007) beschriebenen drei *missense* Mutationen zeigte keine Veränderungen bezüglich der WASH-Komplex Stabilität, d.h. alle Komplexeinheiten ließen sich gegenseitig immunpräzipitieren. Die Interaktion mit dem Retromer-Komplex und die endosomale Lokalisation von WASH-Komplex blieben ebenfalls ungestört (Jia et al. 2010, Freeman et al. 2013). Auch ein dominant negativer Effekt der *missense* Mutationen wie z.B. eine vermehrte Tubulierung der Endosomen und ein gestörter Transport verschiedener Rezeptoren, der in *knockout* Experimenten gezeigt wurde, wurde nicht nachgewiesen (Freeman et al. 2013). Diese verwirrenden Ergebnisse wurden angesichts der Abwesenheit von *trunkierenden* Mutationen im Strumpellin-Gen diskutiert (Freeman et al. 2013). In diesem Zusammenhang neigen die Autoren dieser Studie zu einem durch Haploinsuffizienz bedingten klassischen *loss-of-function* Mutationsmechanismus und vermuten, dass die Mengenreduktion an Gesamt-Strumpellin (was bei einem klassischen *loss-of-function* Allel zu erwarten ist) durch die Hochregulation der Expression des *trans* Wildtyp-Allels kompensiert wird (Freeman et al. 2013). Die quantitativen PCR-Analysen am *knockin* Gewebe der in dieser Arbeit generierten Maus haben gezeigt, dass die humanpathogene p.N471D Mutation weder eine Veränderung der Transkriptmenge von Strumpellin noch von den direkten/indirekten Strumpellin-Interaktionspartnern bewirkt. In Zusammenschau mit unseren negativen Ergebnissen der motorischen und histopathologischen Untersuchungen sowie den negativen Ergebnissen der Neuritenentwicklung in kortikalen Neuronen muss der p.N471D *Knockin* als ein relevantes HSP Tiermodell in Frage gestellt werden.

In einer zu dieser Dissertationsarbeit parallel geführten Studie wurde eine neue Strumpellinvariante präsentiert und die bisher publizierten Mutationen in Bezug auf ihre Pathogenität diskutiert (Jahic et al. 2014). Um die Pathogenität der HSP assoziierten und der

benigen (62 im EVS) *missense* Varianten im Strumpellin einzuschätzen, wurden PolyPhen2-, SIFT- und Grantham-Score benutzt. Durch die Anwendung von diesen drei vorhersagenden Algorithmen wurde die *missense* Variante p.N.471D als „gutartig“ (PolyPhen2) und „tolerierend“ (SIFT) und mit einem relativ niedrigen Grantham-Score (23) evaluiert (Tab. 7).

Tabelle 7: KIAA0196/Strumpellin Varianten assoziiert mit HSP

Mutation	untersuchte Chromosomen ^a	PolyPhen2 (Score)	SIFT (Score)	Grantham Score	Personen mit Mutation	Untersuchungsmethode
p.I226T	400	benign (0,085)	dam. (0,00)	89	2	Exom-Seq.
p.N471D	1000	benign (0,284)	tolerat. (0,13)	23	3	KIAA0196 Seq.
p.R583S	258 ^b	prob.dam. (0,985)	dam. (0,00)	110	2	HSP seq. Panel
p.S591P	0	prob.dam. (0,985)	dam. (0,01)	74	5	KIAA0196 Seq.
p.L619F	1000	prob.dam. (0,997)	dam. (0,01)	22	16	KIAA0196 Seq.
p.V620A	0	prob.dam. (0,963)	tolerat. (0,52)	64	2	KIAA0196 Seq.
p.V626F	1000	prob.dam. (0,996)	dam. (0,00)	50	>20	KIAA0196 Seq.
p.G696A	0	benign (0,288)	dam. (0,00)	60	>20	KIAA0196 Seq.
g.ex11-15del	184 ^b	n.a.	n.a.	n.a.	2	Genom-breites aCHG

Abkürzungen/englische Begriffe: dam., damaging, schädlich; prob.dam., probably damaging, wahrscheinlich schädlich; tolerat., tolerated, toleriert; n.a., nicht anwendbar; Seq., Sequenzierung; aCHG, array comparative hybridization.

^a Anzahl der untersuchten Chromosomen im Rahmen der entsprechenden Studie.

^b Kontrollchromosomen waren von anderen HSP Patienten und nicht von gesunden Kontrollprobanden.

Die Tabelle wurde aus Jahic et al (2014) übernommen und modifiziert.

Außerdem wurde in der genannten Studie auch die Lage der einzelnen pathogenen Varianten im Strumpellin Protein analysiert. In dem Strumpellin Proteinbereich mit Aminosäuren ~580 bis 700 befinden sich 6 von 9 (67%) HSP assoziierten *missense* Varianten (p-Wert: <0,0006; Exakter Test nach Fisher). In diesem Proteinbereich befinden sich nur 4 von 62 (6%) im EVS aufgelisteten benignen *missense* Varianten (p-Wert: 0,22). Dieser Bereich überlappt auch mit einer HSP assoziierten Multi-Exon-Deletion (Abb. 33).

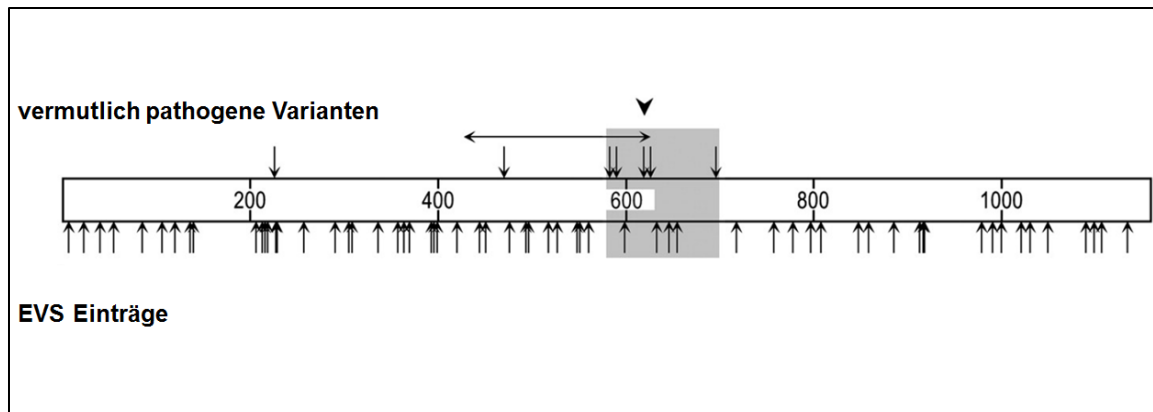


Abbildung 33: Vergleich zwischen vermutlich pathogenen und vermutlich benignen Strumpellin Varianten. Positionierung der einzelnen Varianten entlang der primären Strumpellin Sequenz (Pfeile und großer Pfeilkopf). Der horizontale Doppelpfeil zeigt eine *KIAA0196* Deletion (Exon 11 – Exon 14, Teil von Exon 15), ebenfalls assoziiert mit HSP Typ SPG8. Zahlen beziehen sich auf die Position einzelner Aminosäuren in der Strumpellin Sequenz. Grau markierter Bereich zeigt eine ~120 aminosäuren lange Proteinsequenz, in der vermutlich pathogene und benigne Varianten über- und unterrepräsentiert sind (siehe Text für Details). Die Abbildung wurde aus Jahic et al (2014) übernommen und modifiziert.

Somit wurde gezeigt, dass mindestens zwei von den aktuell neun als pathogen bezeichneten *missense* Varianten (p.I226T und p.N471D) außerhalb der für HSP kritischen Proteinregion liegen und dass ihre HSP-Kausalität angezweifelt werden muss (Jahic et al. 2014). Jedoch schließt diese Analyse deren Pathogenität nicht aus.

Beim Versuch die in der Tabelle 7 aufgeführten Varianten mittels EXaC Datenbank *in silico* zu analysieren, wurden nur Varianten p.I226T und p.R583S gefunden, je ein Allel mit einer Allelenfrequenz von $8,24 \times 10^{-6}$ und $8,248 \times 10^{-6}$ jeweils. Außerdem wurden vier Allele einer synonymen Variante p.N471N mit einer Allelenfrequenz von $3,838 \times 10^{-5}$ gefunden. Die gesuchte p.N471D Variante wurde in dieser Datenbank nicht gefunden.

In Gesamtschau der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und der *in silico* Daten stellt p.N471D *missense* Linie am ehesten ein *Knockin* eines Polymorphismus und somit kein HSP relevantes Mausmodell.

6.3 Charakterisierung der knockout Linie

In dieser Arbeit wurde weiterhin ein *KIAA0196* Maushomolog Allel generiert, in dem der Verlust von Exon 12 in Verschiebung des Leserrahmens resultiert. Die dazugehörige mRNA wurde *in vivo* nicht nachgewiesen, wahrscheinlich als Konsequenz des „*nonsense-mediated decay*“ Mechanismus (Baker et al. 2004). Deshalb repräsentiert diese Allelveränderung ein valides *Knockout*-Allel. In der Studie von Freeman et al (2013) wurde angedeutet, dass die heterozygote Präsenz von solcher Inaktivierungsmutation eine Hochregulation der mRNA Expression im Wildtypallel und/oder eine erhöhte Stabilität von Strumpellin Protein als

kompensatorischen Mechanismus haben kann. Unsere Ergebnisse der quantitativen PCR und der Westernblot-Analyse unterstützen diese Hypothese nicht und zeigen, dass die heterozygote Präsenz von einem *Knockout*-Allel des *KIAA0196* Maushomologs zu der Mengenreduktion von Strumpellin führt. Die beinahe komplette Reduktion von Strumpellin mittels RNAi vermittelten Mechanismus führt zu der Destabilisierung bzw. Reduktion der restlichen WASH-Komplex Subeinheiten (Derivery et al. 2009, Jia et al. 2010). Wir konnten zeigen, dass die Mengenreduktion von Strumpellin um ca. 35% zu einer äquivalenten Mengenreduktion von FAM21 führt. Auch in der Studie von Park et al (2013) wurde eine Mengenreduktion von FAM21 nach Inaktivierung von Strumpellin in Zellen des Schleimpilzes gezeigt. Das ist im Einklang mit der Hypothese der gegenseitigen Abhängigkeit einzelner WASH-Komplex Subeinheiten in Bezug auf die Stabilität vom gesamten WASH-Komplex (Derivery et al. 2009, Jia et al. 2010, Gomez et al. 2009, Gomez et al. 2012). Somit erscheint es plausibel, dass die reduzierte Menge von WASH-Komplex in heterozygoten Strumpellin *Knockout*-Zellen in einer reduzierten WASH-Komplex Gesamtaktivität resultiert. In der Studie von Park et al (2013) wurden durch die Inaktivierung einzelner Komponenten im WASH-Komplex entsprechende Schleimpilzmutanten generiert. CCDC53 und Strumpellin Mutanten zeigten einen deutlich langsameren Wachstum im Vergleich zu Wildtypen und WASH, SWIP und FAM21 Mutanten. Basierend auf diesen Ergebnissen wird in dieser Studie eine zusätzliche Rolle von Strumpellin und auch CCDC53 ggf. außerhalb des WASH-Komplexes vermutet. Die physiologische Rolle des WASH-Komplexes ist bis jetzt nicht ganz klar. Die Studien zeigen den Einfluss auf die Strukturhaltung von Endosomen und Lysosomen (Gomez et al. 2012, Piotrowski et al. 2013, Tyrell et al. 2016), auf die Hemmung der Autophagie (Xia et al. 2013, Zavodszky et al. 2014), aber auch auf die Induktion der Autophagie (King et al. 2013). Durch die Hemmung der Funktion des WASH-Komplexes in Schleimpilz, HeLa und primären murinen Zellen wurden in diesen Studien starke phänotypische Effekte auf der subzellulären Ebene beobachtet. Dabei wurden gezeigt: Kollaps der Zellorganellen, Akkumulation einiger Zelloberflächenrezeptoren in Zellorganellen, verminderte Zelloberflächenexpression bestimmter Zelloberflächenmoleküle wie z.B. TCR, EGFR, CD28, GLUT1 oder LFA-1, defekter intrazellulärer Enzym-, Rezeptor- und Vesikeltransport, komplette Abwesenheit des F-Aktins, Bildung von Aggregaten, reduzierte phagozytische Proteolyse, reduzierter Lipidkatabolismus und dadurch vermehrte intrazelluläre Lipidspeicherung. In dieser Arbeit wurden in primären murinen Fibroblasten der wildtyp und heterozygoter *knockout* Mäuse endo-, lyso- und autophagosomale Kompartimente mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurden keine Abnormitäten der

Endosomen, Lysosomen oder Autophagosomen/Autolysosomen in heterozygoten Strumpellin *knockout* MAFs nachgewiesen. Es ist aber dabei zu betonen, dass die Untersuchung von Autophagosomen/Autolysosomen in einem Basiszustand der Zellen, d.h. ohne Induktion oder Hemmung des Autophagieprozesses, stattgefunden hat. Somit sind morphologische Veränderungen der genannten Zellorganellen nach einer Autophagieinduktion oder –hemmung nicht vollständig ausgeschlossen. Diese Abklärung soll ein Teil einer weiteren Studien sein. Bei einer beinahe kompletten Reduktion einzelner Subeinheiten im WASH-Komplex wie z.B. Wash1, KIAA1033 aber auch Strumpellin wurde eine vermehrte Tubulierung der Endosomen gezeigt (Derivery et al. 2009, Gomez und Billadeau 2009, Harbour et al. 2010). Diese tubulären Strukturen waren auch gleichzeitig für die Retromer Proteine SNX1 und VPS26 positiv (Harbour et al. 2010). Somit wurden Strumpellin wildtyp und heterozygote *knockout* MAFs kultiviert und auf vermehrte Tubulierung mittels Anti-SNX1-Antikörper untersucht. In der quantitativen Auswertung der Daten wurden keine Unterschiede zwischen den zwei Genotypen nachgewiesen. Das bedeutet, dass im Gegensatz zur kompletten Inaktivierung von WASH-Komplex eine moderate Reduktion der WASH-Komplexaktivität genügt, um eine weitgehend normale Funktion der entsprechenden Organellen zu erhalten.

Die Reduktion des Strumpellin/ WASH-Komplexes *in vivo* hat auch keine phänotypischen Konsequenzen. Das eine Argument könnte sein, dass die Axonlänge und das maximale Lebensalter einer Maus, diese zu einem ungeeigneten HSP Modell machen. Jedoch wurde in einigen Studien ein klarer krankheitsrelevanter Phänotyp in Mausmodellen für progrediente Axonopathien gezeigt. Das betrifft z.B. die *Knockouts* von SPAST (Spastin Protein, SPG4) und REEP1 (REEP1 Protein, SPG31). Beide Gene sind mit einer reinen dominant vererbten Form der HSP assoziiert und der dazu führende Mutationsmechanismus ist die Haploinsuffizienz. Entsprechende *Knockouts* zeigen eine progrediente Bewegungseinschränkung, die mit der Menge des vorhandenen Wildtyp-Proteins korreliert (Tarrade et al. 2006, Kasher et al. 2009, Beetz et al. 2013). Während die Mengenreduktion von Spastin und REEP1 pathogen ist, wurde dies für Strumpellin/ WASH-Komplex nicht beobachtet. In den HSP Patienten wurden bis dato keine *KIAA0196* trunkierende Mutationen gefunden. Das Fehlen von großen inaktivierenden Deletionen im *KIAA0196* wurde auch in einer unabhängig von dieser Dissertationsarbeit parallel geführten Studie beschrieben (Jahic et al. 2015). In dieser Studie wurden die Mutationsspektren von *KIAA0196*, SPAST und REEP1 miteinander verglichen und es wurden Differenzen (*KIAA0196* vs. SPAST/REEP1) festgestellt (Jahic et al. 2015). In Gesamtschau der Daten erscheint es plausibel, dass der

heterozygote Strumpellin *Knockout* tolerierbar ist. In der genannten Studie wurden auch die restlichen WASH-Komplex Subeinheiten auf das Vorhandensein von heterozygoten Gesamtdeletionen mittels einer Datenbank untersucht und es wurden in allen WASH-Komplex Subeinheiten große Deletionen entsprechender Gene beschrieben, ohne dass in einzelnen Patientenfällen eine Bewegungsstörung nachgewiesen/beschrieben wurde. Zusammenfassend sprechen die in dieser Dissertationsarbeit erzielten *in vivo* Daten sowie die Daten unserer Studie (Jahic et al. 2015) gegen die Haploinsuffizienz als einen möglichen Mutationsmechanismus in SPG8.

Ein alternativer Mutationsmechanismus zu Haploinsuffizienz bei dominant vererbten Erkrankungen ist der dominant negative Effekt des mutierten Proteins auf das Wildtyp-Protein. Das kann als Konsequenz einen kompletten Funktionsverlust vom restlichen Wildtyp-Protein nach sich ziehen. Die embryonale Letalität in homozygoten Strumpellin Knockouts, die vergleichbar mit der embryonalen Letalität der homozygoten Wash1 (WASH-Komplex) sowie SNX1/2 und VPS26 (beide Einheiten im Retromer-Komplex) *Knockouts* ist (Radice et al. 1991, Schwarz et al. 2002, Gomez et al. 2012, Xia et al. 2013), ist nicht kompatibel mit einem kompletten Funktionsverlust in ansonsten „gesunden“ HSP Patienten. In der Studie von Elliott et al (2013) wurde eine rezessive *KIAA0196* Mutation im äußersten 3' Ende der kodierenden Sequenz beschrieben. Diese Mutation, die eine Protein-Restaktivität besitzt, führt nicht zu einem HSP Phänotyp, sondern sie resultiert in kardialen, zerebellären und kraniofazialen Abnormitäten (Elliott et al. 2013). Diese Symptome entsprechen am ehesten denen, die im Zebrafisch nach einem (inkompletten) Strumpellin Knockdown beobachtet wurden (Clemen et al. 2010).

Damit ist auch der dominant negative Effekt als Mutationsmechanismus in SPG8 unwahrscheinlich.

Da weder die Haploinsuffizienz noch ein dominant negativer Effekt mit den HSP assoziierten Strumpellin Varianten vereinbar sind, bleibt die Frage nach dem potenziellen Mutationsmechanismus weiterhin ungeklärt. Als mögliche Alternative ist der Effekt der toxischen Veränderung der Proteinfunktion bedingt durch eine abnormale Proteinfaltung zu berücksichtigen. In diesem Zusammenhang ist die Interaktion von Strumpellin mit dem zu der Aggregatbildung anfälligen VCP Protein und seine Präsenz in verschiedenen mit Neurodegeneration assoziierten intrazellulären Ablagerungen erwähnenswert (Clemen et al. 2010). Die Tatsache, dass nach Überexpression von mutiertem Strumpellin keine Aggregatbildung beobachtet wurde (Freeman et al. 2013), kann einfach durch die große

zeitliche Differenz (einige Stunden in der Zellkultur vs. klinische Symptome im frühen Erwachsenenalter in HSP Patienten) erklärt werden.

Für die vollständige Klärung des Mutationsmechanismus in SPG8 wird ein geeignetes *in vivo knockin* Modell einer tatsächlich pathogenen Variante benötigt. Laut der vom Autor durchgeführten Meta-Analyse (Jahic et al. 2014) wären *missense* Mutationen zwischen den Positionen ~580–700 hierfür ideale Kandidaten.

7. Schlussfolgerungen

Die autosomal dominant vererbte hereditäre spastische Paraplegie Typ SPG8 ist überwiegend mit *missense* Mutationen im *KIAA0196* Gen Produkt Strumpellin assoziiert. Zum Beginn dieser Dissertationsarbeit war die herkömmliche Interpretation zum Mutationsmechanismus bei SPG8 die Haploinsuffizienz. Somit wurde in dieser Arbeit ein konventioneller *Knockout* für Strumpellin generiert und charakterisiert. Darüber hinaus wurde mit p.N471D eine als humanpathogen beschriebene Strumpellin Variante als *Knockin* generiert und charakterisiert. Es wurde somit angestrebt, ein Mausmodell für die HSP Typ SPG8 zu generieren, um letztlich die pathologische Rolle von Strumpellin und des Strumpellin-enthaltenden WASH-Komplex besser zu verstehen.

Der homo-/heterozygote *Knockin* war lebensfähig und fertil. Der heterozygote *Knockin* hat keinen HSP assoziierten motorischen und histopathologischen Phänotyp. In Zusammenschau mit den Ergebnissen einer *in silico* Analyse ist die p.N471D *missense* Variante wahrscheinlich ein Polymorphismus. Somit ist das generierte p.N471D *knockin* Modell kein geeignetes HSP-Modell.

Der heterozygote *Knockout* war lebensfähig und fertil, während der homozygote *Knockout* schon im Embryonalstadium verstarb. Der heterozygote *Knockout* zeigt ebenfalls keinen HSP-assozierten motorischen Phänotyp und auf vielen weiteren Ebenen wurden Aberrationen ausgeschlossen. Des Weiteren sind bisher keine inaktivierenden Deletionen in SPG8 Patienten gefunden worden. Somit ist der heterozygote *Knockout* ebenfalls kein geeignetes HSP-Modell. Die Mengenreduktion von Strumpellin im heterozygoten *Knockout* führt dennoch zu einer äquivalenten Mengenreduktion von Proteinen im WASH-Komplex wie z.B. Fam21 und somit wahrscheinlich zu einer Reduktion der Gesamtaktivität des WASH-Komplexes. Im Vergleich zu der kompletten WASH-Komplex Inaktivierung scheint diese partielle Verminderung der Gesamtaktivität des WASH-Komplexes keine pathologischen Konsequenzen zu haben. Dies ist insbesondere in Bezug auf die Frage nach der physiologischen Funktion des WASH-Komplexes interessant.

Aber auch für Überlegungen zum Mutationsmechanismus bei SPG8 sind diese Beobachtungen von Bedeutung. Haploinsuffizienz ist aufgrund des fehlenden motorischen Phänotyps und fehlender Veränderungen auf subzellulärer Ebene (Endo-/Lyso-/Autophagosomen) im heterozygoten *Knockout* sehr unwahrscheinlich.

Eine mögliche Alternative, ein dominant negativer Effekt vom mutierten auf das gesunde Allel würde in einer kompletten Geninaktivierung resultieren, was der Situation im homozygoten *Knockout* entspricht. Dessen frühembryonale Lethalität ist jedoch nicht mit dem

Phänotyp der SPG8 Patienten kompatibel. Somit scheint auch dominant negativer Effekt nicht relevant.

Ein weiterer alternativer Mutationsmechanismus wäre eine toxische Veränderung der Proteinfunktion. Um diese Hypothese zur pathologischen Rolle von Strumpellin endgültig zu testen, wäre ein neuer und tatsächlich krankheitsrelevanter *Knockin* nötig.

In Einklang mit den Zielen der vorliegenden Arbeit sind die o.g. Ergebnisse für Aussagen zum Mutationsmechanismus von mutiertem Strumpellin hoch relevant. Sie werfen aber auch zusätzliche interessante Fragen auf. Eine davon ist die Frage nach Embryonalstadium und Ursache der Lethalität im homozygoten *Knockout*. Eng verbunden damit ist die immer noch unbeantwortete Frage nach der physiologischen Rolle von Strumpellin in der Zelle und innerhalb des WASH-Komplexes. Entsprechende Ansätze würden von einer Strumpellin-Inaktivierung *in vivo* stark profitieren.

Um den letalen Phänotyp des homozygoten *Knockouts* umzugehen, sollte ein konditionaler *Knockout* ein sehr wichtiges Werkzeug sein. Mit diesem könnte zu beliebigen Zeitpunkten und/oder in beliebigen Geweben die Expression von Strumpellin spezifisch unterbunden werden. Da solch ein konditionaler *Knockout* ebenfalls mit generiert wurde, ist die vorliegende Arbeit nicht nur von Bedeutung für die Aufdeckung der pathologischen, sondern perspektivisch auch der physiologischen Rolle von Strumpellin.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Alazami AM, Adly N, Al Dhalaan H, Alkuraya FS. A nullimorphic ERLIN2 mutation defines a complicated hereditary spastic paraplegia locus (SPG18). *Neurogenetics*. 2011;12(4):333-6.
- Baker KE, Parker R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(3):293-9.
- Bechara A, Nawabi H, Moret F, Yaron A, Weaver E, Bozon M, et al. FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *EMBO J*. 2008;27(11):1549-62.
- Beetz C, Koch N, Khundadze M, Zimmer G, Nietzsche S, Hertel N, et al. A spastic paraplegia mouse model reveals REEP1-dependent ER shaping. *J Clin Invest*. 2013;123(10):4273-82.
- Bersano A, Del Bo R, Lamperti C, Ghezzi S, Fagioli G, Fortunato F, et al. Inclusion body myopathy and frontotemporal dementia caused by a novel VCP mutation. *Neurobiol Aging*. 2009;30(5):752-8.
- Bettencourt C, Morris HR, Singleton AB, Hardy J, Houlden H. Exome sequencing expands the mutational spectrum of SPG8 in a family with spasticity responsive to L-DOPA treatment. *J Neurol*. 2013;260(9):2414-6.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006;312(5778):1389-92.
- Bonifacino JS, Hurley JH. Retromer. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(4):427-36.
- Bross P, Naundrup S, Hansen J, Nielsen MN, Christensen JH, Kruhoffer M, et al. The Hsp60-(p.V98I) mutation associated with hereditary spastic paraplegia SPG13 compromises chaperonin function both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2008;283(23):15694-700.
- Bultema JJ, Di Pietro SM. Cell type-specific Rab32 and Rab38 cooperate with the ubiquitous lysosome biogenesis machinery to synthesize specialized lysosome-related organelles. *Small GTPases*. 2013 Jan-Mar;4(1):16-21.
- Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):237-51.
- Casari G, Rugarli E. Molecular basis of inherited spastic paraplegias. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(3):336-42.
- Castellani V, Falk J, Rougon G. Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol Cell Neurosci*. 2004;26(1):89-100.
- Chang J, Lee S, Blackstone C. Spastic paraplegia proteins spastizin and spatacsin mediate autophagic lysosome reformation. *J Clin Invest*. 2014;124(12):5249-62.
- Clemen CS, Tangavelou K, Strucksberg KH, Just S, Gaertner L, Regus-Leidig H, et al. Strumpellin is a novel valosin-containing protein binding partner linking hereditary spastic paraplegia to protein aggregation diseases. *Brain*. 2010;133(10):2920-41.
- Cui X, Wang Y, Tang Y, Liu Y, Zhao L, Deng J, et al. Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet*. 2011;20(15):3022-30.
- Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet*. 1997;17(3):346-9.
- de Bot ST, Burggraaff RC, Herkert JC, Schelhaas HJ, Post B, Diekstra A, et al. Rapidly deteriorating course in Dutch hereditary spastic paraplegia type 11 patients. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(11):1312-5.
- de Bot ST, Schelhaas HJ, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BP. Hereditary spastic paraplegia caused by a mutation in the VCP gene. *Brain*. 2012;135(Pt 12):e223; author reply e4.
- de Bot ST, Vermeer S, Buijsman W, Heister A, Voorendt M, Verrips A, et al. Pure adult-onset spastic paraplegia caused by a novel mutation in the KIAA0196 (SPG8) gene. *J Neurol*. 2013;260(7):1765-9.

- Dell'Angelica EC. AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Aug;21(4):552-9.
- Deluca GC, Ebers GC, Esiri MM. The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004;30(6):576-84.
- Depienne C, Stevanin G, Brice A, Durr A. Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr Opin Neurol.* 2007;20(6):674-80.
- Derivery E, Gautreau A. Evolutionary conservation of the WASH complex, an actin polymerization machine involved in endosomal fission. *Commun Integr Biol.* 2010;3(3):227-30.
- Derivery E, Sousa C, Gautier JJ, Lombard B, Loew D, Gautreau A. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell.* 2009;17(5):712-23.
- Dick KJ, Eckhardt M, Paisan-Ruiz C, Alshehhi AA, Proukakis C, Sibbain NA, et al. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat.* 2010;31(4):E1251-60.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 1988 Apr;8(4):1454-68.
- Dymecki SM. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(12):6191-6.
- Eastman SW, Yassaee M, Bieniasz PD. A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J Cell Biol.* 2009;184(6):881-94.
- Ebbing B, Mann K, Starosta A, Jaud J, Schöls L, Schüle R, et al. Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet.* 2008;17(9):1245-52.
- Edwards TL, Clowes VE, Tsang HT, Connell JW, Sanderson CM, Luzio JP, et al. Endogenous spartin (SPG20) is recruited to endosomes and lipid droplets and interacts with the ubiquitin E3 ligases AIP4 and AIP5. *Biochem J.* 2009;423(1):31-9.
- Elliott AM, Simard LR, Coghlan G, Chudley AE, Chodirker BN, Greenberg CR, et al. A novel mutation in KIAA0196: identification of a gene involved in Ritscher-Schinzel/3C syndrome in a First Nations cohort. *J Med Genet.* 2013;50(12):819-22.
- Fanganiello RD, Kimonis VE, Corte CC, Nitrini R, Passos-Bueno MR. A Brazilian family with hereditary inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(4):374-80.
- Fei W, Du X, Yang H. Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(6):204-10.
- Fei W, Shui G, Zhang Y, Krahmer N, Ferguson C, Kapterian TS, et al. A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets. *PLoS Genet.* 2011;7(7):e1002201.
- Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, et al. Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest.* 2004;113(2):231-42.
- Fink JK. Hereditary spastic paraplegia. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006;6(1):65-76.
- Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;126(3):307-28.
- Fink JK. Hereditary spastic paraplegia: clinical principles and genetic advances. *Semin Neurol.* 2014;34(3):293-305.
- Freeman C, Seaman MN, Reid E. The hereditary spastic paraplegia protein strumpellin: characterisation in neurons and of the effect of disease mutations on WASH complex assembly and function. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(1):160-73.

- Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest*. 2007;117(6):1550-7.
- Gidaro T, Modoni A, Sabatelli M, Tasca G, Broccolini A, Mirabella M. An Italian family with inclusion-body myopathy and frontotemporal dementia due to mutation in the VCP gene. *Muscle Nerve*. 2008;37(1):111-4.
- Goldberg JL. How does an axon grow? *Genes Dev*. 2003;17(8):941-58.
- Gomez TS, Billadeau DD. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell*. 2009;17(5):699-711.
- Gomez TS, Gorman JA, de Narvajas AA, Koenig AO, Billadeau DD. Trafficking defects in WASH-knockout fibroblasts originate from collapsed endosomal and lysosomal networks. *Mol Biol Cell*. 2012;23(16):3215-28.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA. Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech*. 1998;41(5):344-58.
- Gruenenfelder FI, Thomson G, Penderis J, Edgar JM. Axon-glial interaction in the CNS: what we have learned from mouse models of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Anat*. 2011;219(1):33-43.
- Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Duyckaerts C, Dumanchin C, Bou J, Dugny F, et al. Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features. *Neurology*. 2006;67(4):644-51.
- Harbour ME, Breusegem SY, Seaman MN. Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended 'tail' of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *Biochem J*. 2012;442(1):209-20.
- Harding AE. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*. 1983;1(8334):1151-5.
- Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 1991;11(11):5586-91.
- Haubenberger D, Bittner RE, Rauch-Shorny S, Zimprich F, Mannhalter C, Wagner L, et al. Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the VCP gene. *Neurology*. 2005;65(8):1304-5.
- Hedera P, Rainier S, Alvarado D, Zhao X, Williamson J, Otterud B, et al. Novel locus for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, on chromosome 8q. *Am J Hum Genet*. 1999;64(2):563-9.
- Hirst J, Irving C, Borner GH. Adaptor protein complexes AP-4 and AP-5: new players in endosomal trafficking and progressive spastic paraplegia. *Traffic*. 2013;14(2):153-64.
- Hooper C, Puttamadappa SS, Loring Z, Shekhtman A, Bakowska JC. Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets. *BMC Biol*. 2010;8:72.
- Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, Gunay-Aygun M, Gahl WA. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:359-86.
- Inloes JM, Hsu KL, Dix MM, Viader A, Masuda K, Takei T, et al. The hereditary spastic paraplegia-related enzyme DDHD2 is a principal brain triglyceride lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(41):14924-9.
- Irintchev A, Simova O, Eberhardt KA, Morellini F, Schachner M. Impacts of lesion severity and tyrosine kinase receptor B deficiency on functional outcome of femoral nerve injury assessed by a novel single-frame motion analysis in mice. *Eur J Neurosci*. 2005;22(4):802-8.
- Ishiura H, Takahashi Y, Hayashi T, Saito K, Furuya H, Watanabe M, et al. Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese

- population based on comprehensive mutational analyses. *J Hum Genet.* 2014;59(3):163-72.
- Jahic A, Khundadze M, Jaenisch N, Schüle R, Klimpe S, Klebe S, et al. The spectrum of KIAA0196 variants, and characterization of a murine knockout: implications for the mutational mechanism in hereditary spastic paraplegia type SPG8. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:147.
- Jahic A, Kreuz F, Zacher P, Fiedler J, Bier A, Reif S, et al. A novel strumpellin mutation and potential pitfalls in the molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegia type SPG8. *J Neurol Sci.* 2014;347(1-2):372-4.
- Jia D, Gomez TS, Metlagel Z, Umetani J, Otwinowski Z, Rosen MK, et al. WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally related complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(23):10442-7.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron.* 2010;68(5):857-64.
- Kakizuka A. Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 1):105-8.
- Karle KN, Möckel D, Reid E, Schöls L. Axonal transport deficit in a KIF5A(-/-) mouse model. *Neurogenetics.* 2012;13(2):169-79.
- Kasher PR, De Vos KJ, Wharton SB, Manser C, Bennett EJ, Bingley M, et al. Direct evidence for axonal transport defects in a novel mouse model of mutant spastin-induced hereditary spastic paraplegia (HSP) and human HSP patients. *J Neurochem.* 2009;110(1):34-44.
- Khundadze M, Kollmann K, Koch N, Biskup C, Nietzsche S, Zimmer G, et al. A hereditary spastic paraplegia mouse model supports a role of ZFYVE26/SPASTIZIN for the endolysosomal system. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003988.
- King JS, Gueho A, Hagedorn M, Gopaldass N, Leuba F, Soldati T, et al. WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion. *Mol Biol Cell.* 2013;24(17):2714-26.
- Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol.* 2014;261:518-39.
- Lukowski R, Weber S, Weinmeister P, Feil S, Feil R. Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum* 2005; (3).
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature.* 1988;336(6197):348-52.
- McDermott C, White K, Bushby K, Shaw P. Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;69(2):150-60.
- Merianda TT, Lin AC, Lam JS, Vuppalandhi D, Willis DE, Karin N, et al. A functional equivalent of endoplasmic reticulum and Golgi in axons for secretion of locally synthesized proteins. *Mol Cell Neurosci.* 2009;40(2):128-42.
- Millecamps S, Julien JP. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(3):161-76.
- Montenegro G, Rebelo AP, Connell J, Allison R, Babalini C, D'Aloia M, et al. Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J Clin Invest.* 2012;122(2):538-44.

- Nalbandian A, Donkervoort S, Dec E, Badadani M, Katheria V, Rana P, et al. The multiple faces of valosin-containing protein-associated diseases: inclusion body myopathy with Paget's disease of bone, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2011;45(3):522-31.
- Newell-Litwa K, Seong E, Burmeister M, Faundez V. Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J Cell Sci*. 2007 Feb 15;120(Pt 4):531-41.
- Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell*. 2005;123(2):277-89.
- Ochiai H. Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site-Specific Endonucleases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):21128-37.
- Orthmann-Murphy JL, Salsano E, Abrams CK, Bizzi A, Uziel G, Freidin MM, et al. Hereditary spastic paraplegia is a novel phenotype for GJA12/GJC2 mutations. *Brain*. 2009;132(Pt 2):426-38.
- Park L, Thomason PA, Zech T, King JS, Veltman DM, Carnell M, et al. Cyclical action of the WASH complex: FAM21 and capping protein drive WASH recycling, not initial recruitment. *Dev Cell*. 2013 Jan 28;24(2):169-81.
- Park SH, Zhu PP, Parker RL, Blackstone C. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1097-110.
- Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(9):710-23.
- Pearce MM, Wormer DB, Wilkens S, Wojcikiewicz RJ. An endoplasmic reticulum (ER) membrane complex composed of SPFH1 and SPFH2 mediates the ER-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem*. 2009;284(16):10433-45.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
- Piotrowski JT, Gomez TS, Schoon RA, Mangalam AK, Billadeau DD. WASH knockout T cells demonstrate defective receptor trafficking, proliferation, and effector function. *Mol Cell Biol*. 2013 Mar;33(5):958-73.
- Poeck K, Hacke W. 2006. *Neurologie*. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Potter KA, Kern MJ, Fullbright G, Bielawski J, Scherer SS, Yum SW, et al. Central nervous system dysfunction in a mouse model of FA2H deficiency. *Glia*. 2011;59(7):1009-21.
- Radice G, Lee JJ, Costantini F. H beta 58, an insertional mutation affecting early postimplantation development of the mouse embryo. *Development*. 1991;111(3):801-11.
- Raposo G, Marks MS. Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Oct;8(10):786-97.
- Raposo G, Marks MS, Cutler DF. Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Aug;19(4):394-401.
- Reid E. The hereditary spastic paraplegias. *J Neurol*. 1999;246(11):995-1003.
- Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, et al. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet*. 2002;71(5):1189-94.
- Renvoise B, Chang J, Singh R, Yonekawa S, FitzGibbon EJ, Mankodi A, et al. Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1(6):379-89.
- Renvoisé B, Stadler J, Singh R, Bakowska JC, Blackstone C. Spg20^{-/-} mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling. *Hum Mol Genet*. 2012 Aug 15;21(16):3604-18.

- Rocco P, Vainzof M, Froehner SC, Peters MF, Marie SK, Passos-Bueno MR, et al. Brazilian family with pure autosomal dominant spastic paraplegia maps to 8q: analysis of muscle beta 1 syntrophin. *Am J Med Genet.* 2000;92(2):122-7.
- Rohen JW. 2001. Funktionelle Neuroanatomie. Stuttgart: Schattauer-Verlag.
- Ryder PV, Vistein R, Gokhale A, Seaman MN, Puthenveedu MA, Faundez V. The WASH complex, an endosomal Arp2/3 activator, interacts with the Hermansky-Pudlak syndrome complex BLOC-1 and its cargo phosphatidylinositol-4-kinase type II α . *Mol Biol Cell.* 2013 Jul;24(14):2269-84.
- Schneider SA, Bhatia KP. Three faces of the same gene: FA2H links neurodegeneration with brain iron accumulation, leukodystrophies, and hereditary spastic paraplegias. *Ann Neurol.* 2010;68(5):575-7.
- Schüle R, Siddique T, Deng HX, Yang Y, Donkervoort S, Hansson M, et al. Marked accumulation of 27-hydroxycholesterol in SPG5 patients with hereditary spastic paresis. *J Lipid Res.* 2010;51(4):819-23.
- Schwarz DG, Griffin CT, Schneider EA, Yee D, Magnuson T. Genetic analysis of sorting nexins 1 and 2 reveals a redundant and essential function in mice. *Mol Biol Cell.* 2002;13(10):3588-600.
- Seaman MN. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol.* 2004 Apr;165(1):111-22.
- Seaman MN, Gautreau A, Billadeau DD. Retromer-mediated endosomal protein sorting: all WASHed up! *Trends Cell Biol.* 2013 Nov;23(11):522-8.
- Seluanov A, Vaidya A, Gorbunova V. Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. *J Vis Exp.* 2010(44).
- Silva MC, Coutinho P, Pinheiro CD, Neves JM, Serrano P. Hereditary ataxias and spastic paraplegias: methodological aspects of a prevalence study in Portugal. *J Clin Epidemiol.* 1997;50(12):1377-84.
- Soderblom C, Blackstone C. Traffic accidents: molecular genetic insights into the pathogenesis of the hereditary spastic paraplegias. *Pharmacol Ther.* 2006;109(1-2):42-56.
- Soderblom C, Stadler J, Jupille H, Blackstone C, Shupliakov O, Hanna MC. Targeted disruption of the Mast syndrome gene SPG21 in mice impairs hind limb function and alters axon branching in cultured cortical neurons. *Neurogenetics.* 2010;11(4):369-78.
- Tarrade A, Fassier C, Courageot S, Charvin D, Vitte J, Peris L, et al. A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum Mol Genet.* 2006;15(24):3544-58.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 1987;51(3):503-12.
- Tyrrell BJ, Woodham EF, Spence HJ, Strathdee D, Insall RH, Machesky LM. Loss of strumpellin in the melanocytic lineage impairs the WASH Complex but does not affect coat colour. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016 Sep;29(5):559-71.
- Valdmanis PN, Meijer IA, Reynolds A, Lei A, MacLeod P, Schlesinger D, et al. Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2007;80(1):152-61.
- Varga RE, Khundadze M, Damme M, Nietzsche S, Hoffmann B, Stauber T, et al. In Vivo Evidence for Lysosome Depletion and Impaired Autophagic Clearance in Hereditary Spastic Paraplegia Type SPG11. *PLoS Genet.* 2015;11(8):e1005454.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013;153(4):910-8.
- Wang X, Yang Y, Li C, Jia J. A novel KIAA0196 (SPG8) mutation in a Chinese family with spastic paraplegia. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(10):1987-9.

- Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet.* 2004;36(4):377-81.
- Wei AH, Li W. Hermansky-Pudlak syndrome: pigmentary and non-pigmentary defects and their pathogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013 Mar;26(2):176-92.
- Winkler J, Ludolph AC. 2004. Neurodegenerative Erkrankungen des Alters. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag.
- Xia CH, Roberts EA, Her LS, Liu X, Williams DS, Cleveland DW, et al. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J Cell Biol.* 2003;161(1):55-66.
- Xia P, Wang S, Du Y, Zhao Z, Shi L, Sun L, et al. WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. *EMBO J.* 2013;32(20):2685-96.
- Yagi T, Ito D, Nihei Y, Ishihara T, Suzuki N. N88S seipin mutant transgenic mice develop features of seipinopathy/BSCL2-related motor neuron disease via endoplasmic reticulum stress. *Hum Mol Genet.* 2011;20(19):3831-40.
- Zavodszky E, Seaman MN, Moreau K, Jimenez-Sanchez M, Breusegem SY, Harbour ME, et al. Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat Commun.* 2014;5:3828.
- Züchner S, Vance JM. Emerging pathways for hereditary axonopathies. *J Mol Med (Berl).* 2005;83(12):935-43.

9. Anhang

Antikörper

Name/Katalognummer	Verdünnung	Hersteller
SMI312	1:1000	HiSS Diagnostics
A-11001 (sekundär)	1:1000	Life Technologies
EEA1 (Ab2900)	1:250	Abcam
EEA1: cy3-anti rabbit (sekundär)	1:500	Dianova
Lamp1 (553792)	1:500	BD Pharmigen
Lamp1: 680 goat anti rat (sekundär)	1:500	Life Technologies
Strumpellin C-14	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Strumpellin: anti-rabbit IgG-HRP (sekundär)	1:10000	DAKO
Fam21	1:500	Geschenk: Matthew N. Seaman (Cambridge)
Fam21: anti-rabbit IgG-HRP (sekundär)	1:10000	DAKO
α -tubulin (T9026)	1:10000	Sigma-Aldrich
α -tubulin: anti-mouse IgG-HRP (sekundär)	1:10000	DAKO

Größenstandards

Name	Größenbereich	Hersteller
100 bp DNA Ladder	100 bp- 1 kb	Genecraft
1 kb DNA Ladder	250 bp- 10 kb	Genecraft
1 kb Plus DNA Ladder	100 bp- 12 kb	ThermoFisher

Oligonukleotide (Primer)

Primer für die Klonierung		
Name	Sequenz	Hersteller
Hind3_SpeI_F	AGCTACTAGTACTAGT	MWG-Operon
BglIII_SpeI_R	GATCACTAGTACTAGT	
NruI_AscI_F	TCGGCAGGCGCGCCCCCTCTGTGCCCATGAG	
Hind3_Mut_R	GAACCAAGCTTGAAGATCTTCTATTAAGACAG	
EcoRI_LoxP_F	GAATTCTATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT	
LoxP_EcoRI_R	ATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATATAGAATTC	
Sequenzierungsprimer für die Kontrolle manipulierter Schnittstellen		
Name	Sequenz	Hersteller
LoxPCR_F	ATAACTTCGTATAATGTATGC	MWG-Operon
LoxPCR_R	ATAACTTCGTATAGCATACAT	
Seq_Ki_F	ACGTTGCTGTTGATGGCTG	
Seq_Ki_R	ACTTTCTTACCTCTTCCAGAG	
MM_Intr12_F	GAGCTCACACCACCTGTCAC	
Primer für die Southernblotsonde		
Name	Sequenz	Hersteller
South_F	CGAAGAACTGCTCACAGTGACTG	MWG-Operon
South_R	GTAGACTGAATTTAGGACTCTGTTTCAGC	
Primer für die Genotypisierung		
Name	Sequenz	Hersteller
Intron 11_F	TTCCGTTCTCCGGAACAC	MWG-Operon
Int11_F_new	CCGTGTCCTGTCCAACAGTC	
Intron11_R	GTTACACTTCTGCATGGCC	
Intron12_R	CGTATCCTGTTAGATACAGC	
Ki_Spez_F	ACGAAGTTATACGGCCGC	
Neo_F	CCTGGCGAATTCGGTACC	
FLPe_TG_F	CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC	
FLPe_TG_R	CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG	
Cre_Seq_F	AAACGTTGATGCCGGTGAACGTGC	
Cre_Seq_R	TAACATTCTCCCACCGTCAGTACG	
Primer für die RT-PCR		
Name	Sequenz	Hersteller
SPG8_Ex11_F	AGCATTACAAGAAGGAGGGC	MWG-Operon
SPG8_Ex13_R	TCCCCGATGATCTGCACTG	
Primer für die qPCR		
Name	Sequenz	Hersteller
Strump_F_1	ACCCACCAAGCAAAAATGAG	Bio Life Technologies
Strump_R_1	TTGTAAGGTTCCCAGGCATC	
Strump_F_2	CTGCCATCACAAAACACAG	
Strump_R_2	GCCAGGAGAGCCTTATTGAG	
Strump_F_3	CCACTAACCCGAGTGGAGAA	
Strump_R_3	CCAGAGCTTGTATTAGTTGCACA	
Fam21_F_1	AGAAGTGGGGAGTGCTGATG	
Fam21_R_1	AGGTGCTGCTTTCATCCTCTAC	
Fam21_F_2	TGGAGCCCAACTTATTTGATG	
Fam21_R_2	TTTAGCCTGGAGGCCAGAG	
Wash1_F	AGGGAAGAAGACTCTAGCAGC	
Wash1_R	TTCTCCAGTTTGCGCTCCTT	
Swip_F	AGACCTCACCAACAGATGCA	
Swip_R	GAGAAGTTCAATGAGCCTGCA	
Vps35_F	GGAAGGTGTAAATGTGGAACGT	
Vps35_R	AACCTGAATGATGCACTCCA	
VCP_F	GGAAGACCCTGATTGCTCGA	
VCP_R	AGGTTGCTCTCAGACTCACC	

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Amir Jahic
Anschrift: Essenerstrasse 15, 10555 Berlin
Email: amir.jahic@gmx.at
Geburtsdatum: 23.09.1980 in Tuzla, Bosnien und Herzegowina, ehem. Jugoslawien

Schulische Ausbildung

1987 – 1999 Grundschule Amalija Lebenicnik, Tuzla
Medizinische Fachhochschule, Fachrichtung Physiotherapie, Tuzla
Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife (1.0)

Hochschulausbildung

09/1999 - 03/2000 Universität Tuzla, Bosnien und Herzegowina
 • Medizinische Fakultät
03/2000 - 03/2001 Universität Wien, Österreich
 • Vorstudienlehrgang, Ergänzungsprüfung Deutsch
03/2001 – 04/2008 Medizinische Universität Wien, Österreich
 • Doktoratsstudium Medizin
05/2008 – 06/2008 UniversitätsSpital Zürich, die Schweiz
 • Unterassistent, Klinik für Rheumatologie
07/2008 – 03/2009 Medizinische Universität Wien, Österreich
 • Doktoratsstudium Medizin

Liste der Publikationen

- 1) Mahmood S*, Beetz C*, Tahir MM, Imran M, Mumtaz R, Bassmann I, **Jahic A**, Malik M, Nürnberg G, Hassan SAA, Rana R, Nürnberg P, Huebner CA (2012) First *HPSE2* missense mutation in Urofacial Syndrome. Clinical Genetics 81:88-92. *equal contribution **IF: 4,247**
- 2) Varga RE, Mumtaz R, **Jahic A**, Rudenskaya GE, Sánchez-Ferrero E, Auer-Grumbach M, Hübner CA, Beetz C (2012) MLPA-based evidence for copy number gain: pitfalls in confirmation and necessity for exclusion of false positives. Analytical Biochemistry 421:799-801. **IF: 2,582**
- 3) Khundadze K, Kollmann K, Koch N, Biskup C, Nietzsche S, Zimmer G, Hennings JC, Huebner AK, Symmank J, **Jahic A**, Ilina EI, Karle K, Schöls L, Kessels M, Braulke T, Qualmann B, Kurth I, Beetz C, Hübner CA (2013) A hereditary spastic paraplegia mouse model reveals essential roles of ZFYVE26/SPASTIZIN for the endolysosomal system. PLoS Genetics 9:e1003988. **IF: 8,167**
- 4) **Jahic A**, Kreuz F, Zacher P, Fiedler J, Bier A, Reif S, Rieger M, Krüger S, Beetz C, Plaschke J. (2014) A novel strumpellin mutation and potential pitfalls in the molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegia type SPG8. Journal of the Neurological Sciences 347:372-374. **IF: 2,474**
- 5) **Jahic A**, Khundadze M, Jaenisch N, Schüle R, Klimpe S, Klebe S, Frahm C, Kassubek J, Stevanin G, Schöls L, Brice A, Hübner CA, Beetz C. (2015) The spectrum of *KIAA0196* variants, and characterization of a murine knockout: implications for the mutational mechanism in hereditary spastic paraplegia type SPG8. Orphanet Journal of Rare Diseases 10:147. **IF: 3,358**
- 6) **Jahic A**, Erichsen AK, Deufel T, Tallaksen C, Beetz C. (2016) A polymorphic *Alu* insertion which mediates distinct disease-associated deletions. Eur J Hum Genet doi: 10.1038/ejhg.2016.20. **IF: 4,349**
- 7) Harlalka GV, McEntagart ME, Gupta N, Skrzypiec A, Chioza B, Simpson MA, Nair A, Pereira A, Günther S, **Jahic A**, Modarres H, Moore-Barton H, Trembath RC, Kabra M, Baple E, Takur S, Patton MA, Beetz C, Pawlak R, Crosby AH. (2016) Novel genetic, clinical and pathomechanistic insights into *TFG*-associated hereditary spastic paraplegia. Hum Mutat. 2016 Aug 5. doi: 10.1002/humu.23060. **IF: 5,089**
- 8) Breen C, Mercer J, Jones SA, **Jahic A**, Heptinstall L, Tylee K, Newman WG, Beetz C. (2016) Maternal mosaicism for *IDUA* deletion clarifies recurrence risk in MPS I. Hum Genome Var. 2016 Oct 6;3:16031. **IF: folgt**
- 9) **Jahic A**, Hinreiner S, Emberger W, Hehr U, Zuchner S, Beetz C. (2016) Doublet-mediated DNA rearrangement - a novel and potentially underestimated mechanism for the formation of recurrent pathogenic deletions. Human Mutat. 2016 Dec. **IF: 5,089**

Verzeichnis bereits eingeworbener Drittmittel

- 1) „Die Rolle von Strumpellin für den Langzeiterhalt axonaler Integrität“
Projektleiter: Dr. med. univ. Amir Jahic;
Förderinstitution: IZKF Jena; Art der Förderung: Rotationsstellen 2012; Laufzeit und Fördervolumen: 12 Monate, Personalmittel als eigene Stelle (ca. 65T)

- 2) „Defining requirements for long-term axonal integrity by analysing mouse lines with alterations in the axonopathy-associated protein strumpellin“
 Projektleiter: Dr. med. univ. Amir Jahic;
 Förderinstitution: Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL); Art der Förderung: DGKL-Nachwuchsakademie 2014; Laufzeit und Fördervolumen: Einmalförderung, 8T
- 3) „*In vitro* und *in vivo* Ansätze zur Aufklärung der Rolle von TFG für den Langzeiterhalt langer Axone“
 Projektleiter: Dr. med. univ. Amir Jahic;
 Förderinstitution: IZKF Jena; Art der Förderung: Juniorprojektförderung 2016; Laufzeit und Fördervolumen: 18 Monate, 52.5T

Tagungsbeiträge

- 1) **Jahic A**, Kreuz F, Zacher P, Fiedler J, Bier A, Reif S, Rieger M, Krüger S, Beetz C, Plaschke J. A novel strumpellin mutation and potential pitfalls in the molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegia type SPG8. 13. Jahrestagung der DGKL. 28.-30. September 2016; Mannheim.
- 2) **Jahic A**, M. Kiehntopf M, Böer K. New Abbott methotrexate immunoassay is suitable for the follow up of high dose methotrexate therapy. 12. Jahrestagung der DGKL. 14.-17. Oktober 2015; Leipzig.
- 3) **Jahic A**, Khundadze M, Hübner C, Beetz C. Hereditary Spastic Paraplegia in mice: *in vivo* models for neurodegeneration. 11. Jahrestagung der DGKL. 24.-27. September 2014; Mannheim.
- 4) **Jahic A**, Varga RE, Kiehntopf M, Beetz C. Homemade MLPA assays as an attractive alternative to commercial developments. 9. Jahrestagung der DGKL. 26.-29. September 2012; Mannheim.
- 5) **Jahic A**, Beetz C. MLPA-based evidence for genomic duplications/amplifications needs methodologically independent validation. *IFCC-WorldLab and EuroMedLab*. 15.-19. May 2011; Berlin.

Wissenschaftliche Vorträge

Aufklärung der pathobiochemischen Grundlagen für erbliche Axonopathien:
 Generierung und Analyse von genetischen Mausmodellen. Staudinger Symposium.
 05-07. Juli 2016; Kloster Banz.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Deufel gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung eines interessanten Themas.

Mein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Michael Kiehntopf für sein Vertrauen und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu dürfen sowie für seine Bereitschaft als Zweitbetreuer anzutreten.

Herrn Prof. Dr. Christian Hübner danke ich für die Annahme als Doktorand und die Übernahme der Hauptbetreuung. Danke für das Verständnis den Abgabetermin aufgrund meiner Routine-, Lehr- und Forschungstätigkeiten mehrmals verschieben zu müssen sowie für die gewährte Unterstützung, für die Korrektur meiner Dissertationsarbeit und die konstruktiven Gespräche.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Beetz für kompetente fachliche Unterstützung während der gesamten Dissertation, ständige Weiterentwicklung der Promotionsarbeit, rege Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft in allen Fragen sowie das mehrmalige gründliche Korrekturlesen der Dissertationsschrift. Lieber Christian, ohne Deine Unterstützung, die vielen guten Ideen und Projekte, die exzellente Analyse der Daten wäre die Teilveröffentlichung dieser Dissertation nicht möglich gewesen! Weiterhin danke ich Dir für die Bereitschaft mich bei der erfolgreichen Antragstellung bei dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) des Universitätsklinikums Jena und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) unterstützt zu haben. Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Clemen bedanken, der sich freundlicher Weise als externer Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Für die Unterstützung bei der Erzeugung der Strumpellin Mausmodelle danke ich insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Mukhran Khundadze und Frau Katrin Schorr.

Für die Unterstützung beim Lösen der Genotypisierungsprobleme danke ich Frau Kerstin Stein. Frau Heike Kiesewetter danke ich für die angenehme Zusammenarbeit während der Phänotypisierungsversuche. Frau Annette Büschell danke ich für die Geduld und die Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten. Für die Hilfe bei der institutsinternen Sequenzierung danke ich Frau Cora Richert.

Für die Betreuung der Mäuse danke ich Susette Lobert, Angela Subarew, Annett Ellinger und Ronny Häuser in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Jena.

Für die unkomplizierte Durchführung der quantitativen PCR möchte ich mich bei Frau Dr. Christiane Frahm, Frau Dr. Nadine Jänisch und Frau Bettina Rudolph bedanken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Christian Hübner, Dr. Christian Beetz, PD Dr. Dr. Michael Kiehntopf und Dr. rer. nat. Mukhran Khundadze,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 24.10.2017

Dr. med. univ. Amir Jahic